

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Rôle de la leptine dans la reproduction du mouton: son expression, sa sécrétion et son récepteur

Ravet, Stéphanie

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**RÔLE DE LA LEPTINE DANS LA REPRODUCTION DU MOUTON:
SON EXPRESSION, SA SECRETION ET SON RECEPTEUR**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Stéphanie RAVET

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Rôle de la leptine dans la reproduction du mouton :
son expression, sa sécrétion et son récepteur**

RAVET Stéphanie

Résumé

La leptine, une hormone protéique synthétisée et sécrétée par le tissu adipeux, s'est révélée jouer un rôle physiologique sur la nutrition, l'état corporel et la reproduction chez plusieurs espèces dont le mouton. Ce mémoire est ciblé sur l'étude du rôle de la leptine dans différents paramètres de la reproduction chez la brebis. L'expression de la leptine et son récepteur, ainsi que la sécrétion de cette dernière ont été analysées. Dans ce but, plusieurs techniques déjà utilisées dans le laboratoire ont dû être adaptées à l'étude de cette hormone et deux autres techniques ont été mises au point. Une grande partie de ce travail a été la mise au point d'une technique de RT-PCR quantitative compétitive qui a permis de mesurer l'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux. Une première approche immunohistochimique du récepteur à la leptine a, quant à elle, permis de localiser celui-ci dans les tissus adipeux et reproducteurs. La cohérence des résultats obtenus grâce à ces nouvelles techniques permet de valider celles-ci. Elles pourront donc être utilisées dans des études ultérieures sur les effets de la leptine chez le mouton. Une étude assez large visant à relever de nombreux paramètres zootechniques et physiologiques en relation avec la leptine a été entreprise. Elle a permis de détailler les relations entre certains paramètres et de dégager des premières conclusions intéressantes qui pourront être étayées par des expériences plus précises.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: J.-L. Bister

Co-promoteur: R. Paquay

Au terme de ce travail, je tiens à témoigner mon entière reconnaissance envers

le Professeur R. Paquay, pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein du département de Physiologie Animale et pour les conseils qu'il m'a prodigués lors de la rédaction de ce travail,

mon promoteur, le Docteur Jean-Loup Bister, pour m'avoir accompagnée tout au long de la rédaction de ce travail,

Fabienne, pour son appui scientifique, sa grande disponibilité, ses conseils pratiques et pour ses connaissances qui m'ont tant apporté dans la réalisation de ce travail. Je n'oublierai pas non plus la patience qu'elle a eue envers moi et l'intérêt qu'elle a porté à mes recherches,

Marie-Antoinette, pour son aide précieuse à la réalisation technique de ce travail, son soutien moral et sa bonne humeur,

tous les membres du département, pour la bonne ambiance qui régnait au labo, ainsi que le personnel de Faulx-Les-Tombes pour leur assistance et l'accueil qu'ils m'ont réservé,

mes parents, pour leurs encouragements, leur confiance et leur soutien tout au long de ces années d'étude,

A tous,

Merci beaucoup.

Stéphanie.

Introduction.....	1
Chapitre I : Revue bibliographique	2
1.Gène et structure de la leptine.....	2
2.Récepteurs à la leptine et signaling intracellulaire	4
3.Fonctions de la leptine	8
3.1.Régulation de l'appétit	9
3.2.Rôle dans le métabolisme lipidique	10
3.3.Reproduction	11
3.4.Gestation et lactation	16
3.5.Système immunitaire	21
4.Modèles <i>in vivo</i> de déficience, résistance et excès de leptine.....	21
5.Régulation de l'expression et des voies métaboliques de la leptine	22
5.1.Neuromédiateurs.....	23
5.2.Effets de la photopériode et du niveau alimentaire	24
5.3.Insuline, glucocorticoïdes, GH.....	25
5.4.Autorégulation	26
5.5.Stéroïdes sexuels.....	27
5.6.Facteurs génétiques	27
Chapitre II : Objectifs	29
Chapitre III : Mise au point d'une technique de RT-PCR quantitative compétitive.....	31
1.Principe d'une RT-PCR.....	31
2.Principe d'une RT-PCR semi-quantitative.....	31
3.Principe d'une RT-PCR quantitative compétitive.....	32
4.Mise au point de la technique	33
4.1.Synthèse du compétiteur par RT-PCR et transcription <i>in vitro</i>	33
4.2.RT-PCR quantitative compétitive	36
4.3.Analyse des résultats.....	37
Chapitre IV : Matériel et méthodes.....	41
1.Plan expérimental	41
2.Techniques de base	42
2.1.Alimentation.....	42
2.2.Pesées.....	42
2.3.Estimation de l'état corporel	42
2.4.Prises de sang	42
3.Prélèvements de tissus adipeux.....	43

4.Extraction de l'ARN	44
4.1.Principe.....	44
4.2.Matériel	44
4.3.Réactifs et solutions	44
4.4.Protocole	45
5.Dosage des acides nucléiques	46
5.1.Principe.....	46
5.2.Matériel	46
5.3.Réactifs et solutions	46
5.4.Protocole	46
6.RT-PCR.....	47
6.1.Principe.....	47
6.2.Matériel	47
6.3.Réactifs et solutions	47
6.4.Protocole	48
7.RT-PCR semi-quantitative	49
7.1.Principe.....	49
7.2.RT-PCR.....	51
7.3.Electrophorèse sur gel d'agarose.....	51
8.RT-PCR quantitative compétitive.....	52
8.1.Synthèse de l'ARN compétiteur	52
8.2.RT-PCR compétitive.....	58
9.Electrophorèse sur gel d'agarose.....	59
9.1.Principe.....	59
9.2.Matériel	59
9.3.Réactifs et solutions	59
9.4.Protocole	59
10.Séquençage de l'ADN.....	61
11.Dosages hormonaux	64
11.1.Principe du dosage R.I.A.	64
11.2.Appareillage	64
11.3.Calcul des résultats	65
11.4.Dosage de l'oestradiol (E ₂).....	65
11.5.Dosage de la FSH.....	66
11.6.Dosage de la LH.....	66
11.7.Dosage de la leptine	67
12.Mise en évidence des récepteurs à la leptine par immunohistochimie	67
12.1.Principe	67
12.2.Prélèvements tissulaires	68
12.3.Préparation histologique	68
12.4.Préparation immunologique	69

12.5. Coloration à l'hématoxyline.....	69
12.6. Contrôles.....	69
13. Analyses statistiques.....	70
Chapitre V : Résultats.....	71
1. Etat corporel, taux d'ovulation et fécondité.....	71
2. Expression de l'ARNm de la leptine au niveau du tissu adipeux.....	73
2.1. Extraction de l'ARN : dosage.....	73
2.2. Mise au point de la technique de RT-PCR quantitative compétitive.....	75
2.3. RT-PCR semi-quantitative.....	76
2.4. Comparaison des deux méthodes.....	77
2.5. Relation entre le taux d'ARNm de leptine et les différents paramètres étudiés.....	77
3. Dosages R.I.A.	78
3.1. Dosage de la leptine.....	78
3.2. Dosage de la FSH.....	80
3.3. Dosage de l'E ₂	80
3.4. Dosage de la LH.....	81
3.5. Relation entre les différentes hormones.....	81
4. Immunohistochimie.....	82
Chapitre VI : Discussion des résultats.....	83
1. Objectifs.....	83
2. Méthodes.....	83
3. Mise au point d'une technique de RT-PCR quantitative compétitive.....	84
4. Analyses zootechniques.....	84
5. Leptine et paramètres zootechniques.....	85
6. Leptine et autres hormones reproductrices.....	86
7. Immunohistochimie.....	87
Conclusion et perspectives.....	88
Références bibliographiques.....	89
Annexes.....	94

Liste des abréviations

AgRP	agouti-related peptide
ARC	noyau arqué
BCS	Body Condition Score
BMI	Body Mass Index
C/EBPa	CCAAT/Enhancer binding protein-a
CART	cocaïne and amphetamine-regulated transcript
CRH	corticotropin-releasing hormone
DMH	noyau hypothalamique dorsomédian
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FSH	follicle stimulating hormone
GH	growth hormone
GnRH	gonadotropin releasing hormone
IGF-1	insulin-like growth factor 1
JAK	Janus family tyrosine kinase
L.H.	noyau hypothalamique latéraux
LH	luteinizing hormone
LHRH	luteinizing hormone releasing hormone
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MC	mélanocortine
NPY	neuropeptide Y
POMC	proopiomélanocortine
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ

R.I.A.	Radio Immuno Assay
SH ₂	Src-like homology 2
SHP-2	SH2-containing phosphatase
SOCS-3	suppressor of cytokine signaling-3
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TGF- β	transforming growth factor
α -MSH	α -melanocyte-stimulating hormone

Introduction

La leptine, une hormone protéique synthétisée et sécrétée par le tissu adipeux, s'est révélée jouer un rôle physiologique sur la nutrition, l'état corporel et la reproduction chez plusieurs espèces dont le mouton. Depuis sa découverte en 1994, plus de 3000 articles ont été publiés sur la leptine, faisant d'elle un des thèmes les plus prisés en recherche scientifique.

La biologie de la leptine a été étudiée plus largement chez les rongeurs et chez les humains. La leptine est principalement produite par le tissu adipeux blanc et agit via une famille de récepteurs membranaires, incluant un isoforme avec un long domaine intracellulaire (OB-Rb) qui est exprimé de façon prédominante dans les régions hypothalamiques impliquées dans la régulation de la nutrition et de l'homéostasie énergétique.

Les voies de transduction du signal utilisées par la leptine commencent à être élucidées, en particulier JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription), MAPK (mitogen-activated protein kinase), et SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3), qui sont impliqués comme médiateurs et modulateurs des effets de la leptine au niveau cellulaire.

Des études ont démontré qu'un état d'excès, de déficience ou de résistance à la leptine peut être associé à une fonction reproductrice anormale.

La leptine apparaît être une hormone pléiotrope affectant divers tissus de l'organisme.

De récentes recherches ont démontré que la leptine joue un rôle dans la physiologie normale du système reproducteur avec des interactions complexes à tous les niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

L'expression des récepteurs à la leptine dans d'autres sites tels que le placenta, les tissus fœtaux et les cellules épithéliales mammaires suggère que la leptine a des rôles régulateurs additionnels dans la gestation, la parturition, la croissance fœtale et la lactation. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser les rôles et l'importance de la leptine dans chacun de ces processus reproducteurs.

Outre ces fonctions, la leptine agit directement sur les cellules immunitaires.

Les effets de la leptine sur la nutrition et l'homéostasie énergétique sont centraux et médiés par un réseau de neuropeptides orexigéniques tels que le neuropeptide Y (NPY), la galanine et la mélanocortine (MC), et de neuropeptides anorexigéniques tels que la proopiomélanocortine (POMC) et le cocaïne- and amphetamine-regulated transcript (CART).

Chez les ruminants en croissance et en lactation, une relation positive existe entre l'adiposité et la concentration en leptine plasmatique.

Cependant, la définition des rôles de la leptine est encore très controversée chez les ruminants. Des recherches supplémentaires sont requises pour définir ces rôles et ceux du système nerveux central dans l'orchestration du métabolisme.

Ce travail a pour but d'étudier l'expression et la sécrétion de la leptine dans des groupes de brebis soumises à différentes conditions alimentaires et l'influence de cette hormone sur différents paramètres de la reproduction.

Chapitre I :

Revue bibliographique

Les caractéristiques générales de la leptine

1. Gène et structure de la leptine

Leptine provient du grec : 'leptos' signifiant 'mince'. Découverte en 1994, cette hormone protéique, codée par le gène ob, est synthétisée et sécrétée principalement par les tissus adipeux (Zhang *et al.*, 1996), mais aussi par le placenta (Masuzaki *et al.*, 1997 in Caprio *et al.*, 2001), l'estomac (Bado *et al.*, 1998 in Caprio *et al.*, 2001) et le muscle squelettique (Wang *et al.*, 1998 in Caprio *et al.*, 2001).

Chez l'humain, le gène ob est localisé sur le chromosome 7q31.3. Il encode pour un ARNm de 4,5 Kb avec une ORF de 167 acides aminés. Après clivage du peptide signal, la protéine mature résultante est de 16 KD et contient 146 acides aminés. Elle se présente sous la forme d'une seule séquence avec un pont disulfure en région C-terminale, important pour la stabilité et la bioactivité (Rock *et al.*, 1996 in Blum, 1997). Chez le bovin, le gène ob est localisé sur le chromosome 4 (Pomp *et al.*, 1997 in Chilliard *et al.*, 1999) et encode un ARNm de 3,1 Kb (Ji *et al.*, 1998 in Chilliard *et al.*, 1999), tandis que chez l'ovin, l'ARNm est de 4,1 à 4,5 Kb (Chilliard *et al.*, 1999).

La structure secondaire de la leptine, formée de 4 hélices alpha, permet de l'assigner à la classe des cytokines hématopoïétiques (Madej *et al.*, 1995 in Blum, 1997).

La structure cristalline de la protéine Ob humaine (leptine-E100), obtenue par la méthode de diffraction aux rayons X avec une résolution de 2.40 Å, comporte quatre hélices- α anti-parallèles, connectées par deux longs crosslinkers et un petit loop, et un court segment hélicoïdale additionnel (en jaune) (figure 1).

Selon une analyse du gène de leptine bovin, 20 polymorphismes ont été détectés dans la séquence de 1788 bp étudiée et correspondent tous à des substitutions d'un seul nucléotide bi-allélique. La fréquence de ces polymorphismes est de 1/89 bp. Parmi ces 20 polymorphismes, six se produisent dans les exons à une fréquence de 1/84 bp, mais n'ont pas d'effet négatif sur la fonction de la protéine. D'autres se produisent dans les introns à une fréquence de 1/92 bp (Konfortov *et al.*, 1999).

La séquence protéique de la leptine est plus ou moins bien conservée entre espèces. En effet, on observe que la séquence de la région codante ovine possède 96 % d'homologie avec la séquence bovine, ce qui correspond à une différence de seulement 2 acides aminés ; 93 % d'homologie avec la séquence porcine ; 88 % avec la séquence humaine ; 84 % avec la séquence murine ; et 82 % avec la séquence du rat (Kumar *et al.*, 1998 in Chilliard *et al.*, 1999) (Dyer *et al.*, 1997a).

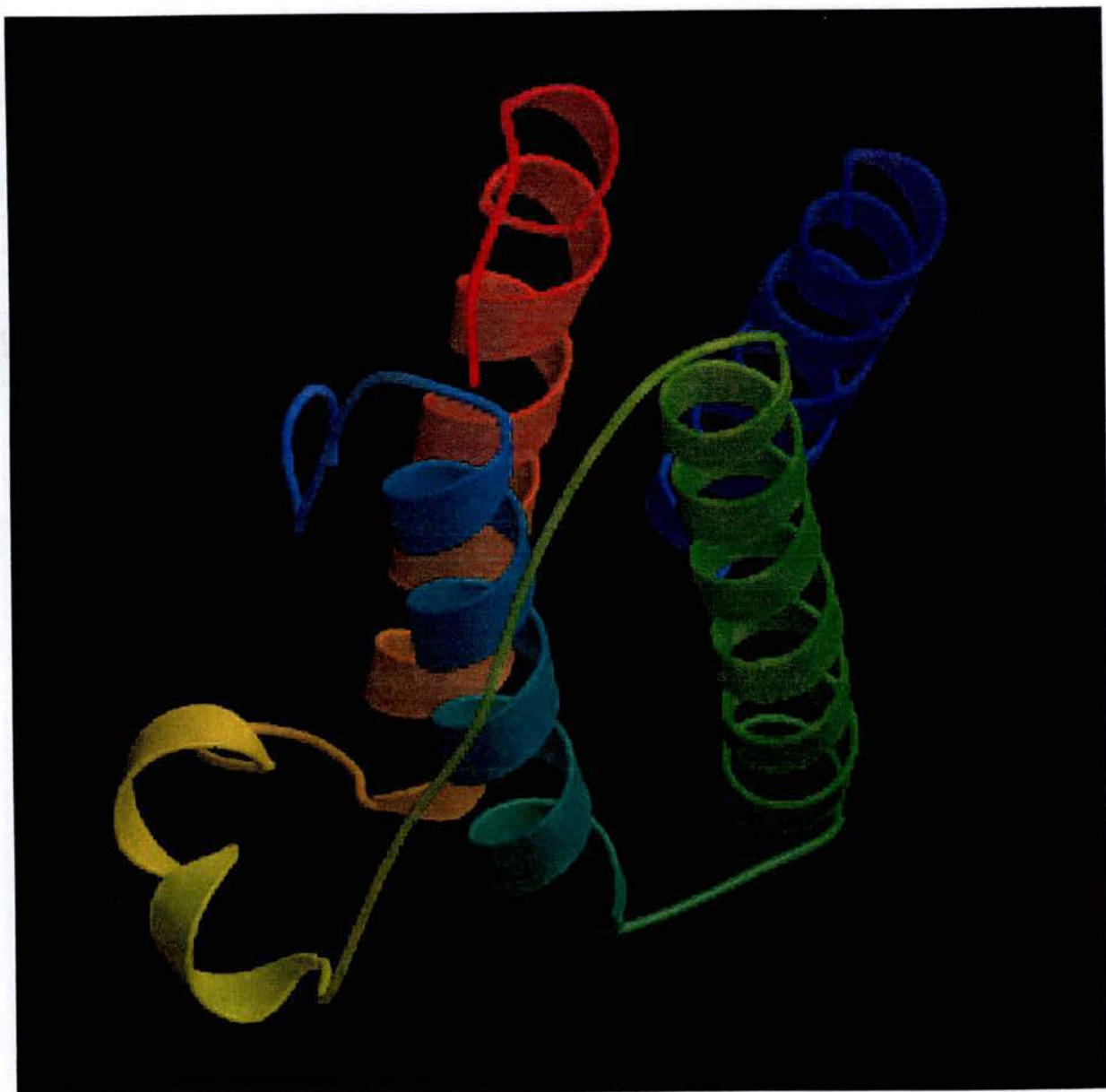


Figure 1 : Structure cristalline de la protéine Ob humaine (leptine-E100) (Zhang *et al.*, 1997).

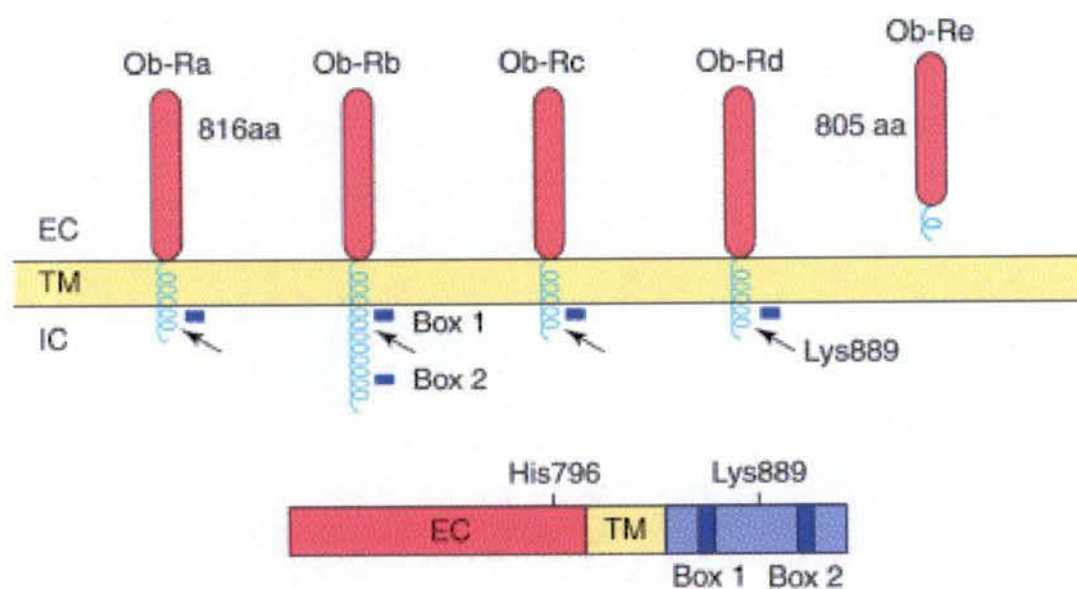
2. Récepteurs à la leptine et signaling intracellulaire

Le récepteur à la leptine, Ob-R, est une protéine membranaire encodée par le gène *db* et homologue aux membres de la famille gp130 des récepteurs aux cytokines de classe I (Caprio *et al.*, 2001).

Il existe au moins 5 épissages variables de l'ARNm de ce récepteur chez la souris et l'humain, donnant des récepteurs avec des longueurs variables du domaine intracellulaire : Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re (Tartaglia *et al.*, 1997 in Caprio *et al.*, 2001).

Tous ces isoformes, à l'exception de Ob-Re, montrent une structure identique jusqu'au résidu Lys889 ; à cette position d'acide aminé, les séquences protéiques divergent (figure 2).

Uniquement l'Ob-Rb contient les deux motifs protéiques (Box 1 et Box 2) très conservés dans les récepteurs cytokines de classe I et capables d'activer les transducteurs du signal Janus Kinase et les activateurs de transcription (JAK-STAT). Ob-Re est identique aux autres isoformes Ob-R en amont du résidu His796, à partir duquel la séquence protéique diverge, se terminant après un neuvième acide aminé additionnel. Ce récepteur est probablement soluble (Caprio *et al.*, 2001).



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figure 2 : Représentation schématique des différentes formes du récepteur à la leptine (Caprio *et al.*, 2001).

aa : acide aminé
EC : extracellulaire
IC : intracellulaire
TM : transmembranaire

Ob-Rb, ou encore appelé Ob-RL, est la forme longue du récepteur qui possède une région cytoplasmique complète de 302 acides aminés contenant les différents motifs requis pour la transduction du signal. Les quatre autres formes ont un domaine cytoplasmique plus court de 30 à 40 acides aminés (Lee *et al.*, 1996 in Brann *et al.*, 2002).

L'isoforme Ob-Rb est aussi le seul récepteur à la leptine qui contient des résidus tyrosines intracellulaires qui, lorsqu'ils sont phosphorylés, permettent l'interaction avec des protéines de signaling spécifiques (Tartaglia *et al.*, 1995) (Tartaglia *et al.*, 1997 in Brann *et al.*, 2002).

Le signaling semble être initié par une homo-dimérisation du récepteur induite par le ligand. Les voies de transduction du signal récepteur-médiées régulées par la leptine impliquent des membres de la famille Jak, des transducteurs du signal et des activateurs transcriptionnels tels que STAT, ainsi que la voie des MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase) (Baumann *et al.*, 1996 ; Bjørbæk *et al.*, 1997 ; Banks *et al.*, 2000 ; Rosenblum *et al.*, 1996 ; Yamashita *et al.*, 1998 ; Ghilardi *et al.*, 1996 in Brann *et al.*, 2002).

La voie de transduction (figure 3) est activée par la liaison de la leptine au domaine extracellulaire du dimère Ob-Rb. Des études de transfection ont démontré que la liaison du ligand à Ob-Rb résulte en l'activation de la voie de signaling JAK/STAT, tandis que les cellules transfectées avec Ob-Ra ne montrent pas d'activation JAK/STAT induite par la leptine (Ghilardi et Skoda, 1997 in Brann *et al.*, 2002).

De plus, l'incapacité de la leptine à induire l'activation de STAT 3 chez les souris db/db, qui ont un récepteur Ob-Rb tronqué, semble être due au fait que ces souris manquent d'un motif YXXQ dans la queue cytoplasmique du récepteur Ob-Rb, lequel représente un motif consensus de liaison à STAT 3 (Tartaglia *et al.*, 1995).

De récentes recherches ont montré que les facteurs de transcription nucléaire c-fos, c-jun et erg-1 sont régulés par la leptine et participent potentiellement au signaling de la leptine (Bjørbæk *et al.*, 2000a ; Murakami *et al.*, 1997 ; Uotani *et al.*, 1999 in Brann *et al.*, 2002). Cependant, des travaux ultérieurs sont nécessaires pour comprendre plus précisément la contribution de ces facteurs dans le signaling de la leptine. Néanmoins, ces découvertes suggèrent que la régulation des gènes cibles par STAT 3 joue un rôle médiateur important dans le signaling de la leptine qui semble être critique pour la capacité de la leptine à réguler la prise de nourriture et le métabolisme énergétique in vivo (Brann *et al.*, 2002).

Alors que les voies de transduction responsables des actions de la leptine sont pratiquement élucidées, les mécanismes qui limitent le signaling de la leptine sont beaucoup moins connus. De récentes études à ce sujet ont démontré que STAT 3 induit la transcription d'un gène encodant pour un suppresseur de cytokines signaling-3 (SOCS-3) (Bjørbæk *et al.*, 1998 in Brann *et al.*, 2002). La famille des protéines SOCS-3 consiste en huit membres dont chacun contient un domaine d'homologie-Src (SH2) et une boîte SOCS C-terminale (Starr *et al.*, 1997 in Brann *et al.*, 2002). Les protéines SOCS sont induites par une variété de cytokines et fonctionnent en inhibant la transduction du signal médiée par les cytokines et donc, en jouant un rôle de feedback négatif (Brann *et al.*, 2002).

En effet, on a démontré que la surexpression de SOCS-3 résulte en l'inhibition de la phosphorylation d'une tyrosine de JAK2 induite par la leptine, empêchant ainsi l'activation de la voie JAK/STAT suite à l'addition de leptine (Bjørbæk *et al.*, 1999 in Brann *et al.*, 2002).

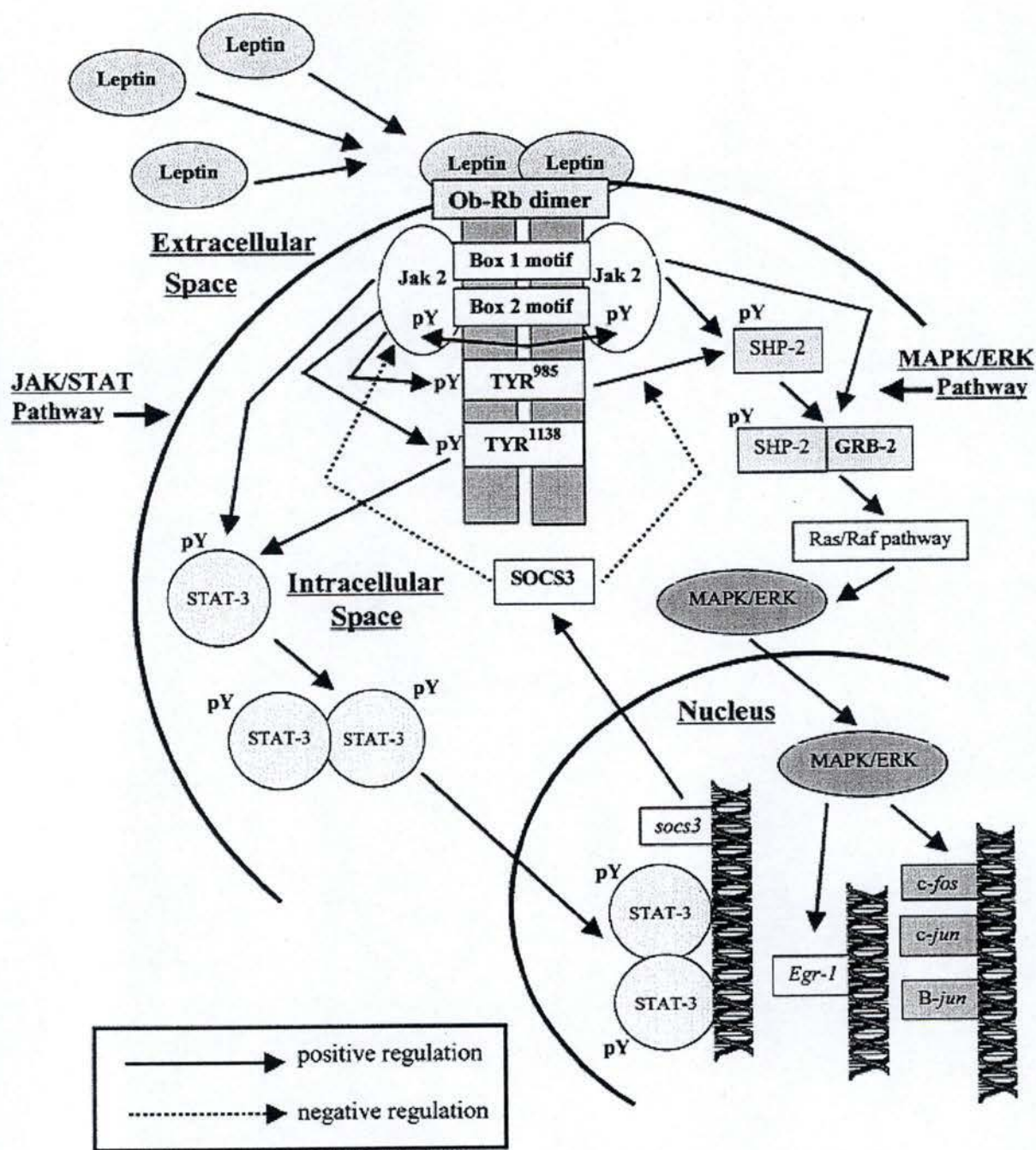


Figure 3 : Signaling intracellulaire de l'isoforme Ob-Rb du récepteur à la leptine (Brann *et al.*, 2002).

Jak2 se lie aux motifs Box1 et Box2 sur le récepteur, menant à la transphosphorylation et l'activation de Jak2. Jak2 activée phosphoryle à son tour les résidus Tyr985 et Tyr1138 du récepteur à la leptine. Ces 2 Tyr-P lient respectivement SHP-2 et STAT-3, qui sont alors phosphorylés par Jak2. Le dimère SHP-2/Tyr985-P lie GRB-2, résultant en l'activation de la voie MAPK/ERK impliquant Ras/Raf. GRB-2 peut aussi être activé directement par Jak2. Le dimère MAPK/ERK activé est transloqué dans le noyau, où il induit la transcription des gènes tels que *c-fos*, *B-jun* et *egr-1*. Les STAT-3/Tyr-P dimérisent et le dimère est transloqué dans le noyau, où il induit la transcription des gènes de réponse à STAT-3 tel que *SOCS 3*. Après traduction de l'ARNm *SOCS 3* et translocation dans le cytoplasme, *SOCS 3* se lie à Tyr985-P et bloque la voie de SHP-2/MAPK/ERK. Elle peut aussi lier Jak2 directement, agissant ainsi comme feed-back négatif sur le signaling du récepteur à la leptine (Brann *et al.*, 2002).

SOCS-3 inhibe le signaling de la leptine en se liant à la Tyr-985 phosphorylée sur le récepteur à la leptine, bloquant alors l'interaction de ce résidu avec la SH2-containing phosphatase (SHP-2), une tyrosine phosphatase (Bjørnbæk *et al.*, 2000b ; Li et Friedman, 1999 in Brann *et al.*, 2002). SHP-2 est exprimée ubiquitairement et agit généralement en régulant positivement le signaling des cytokines. Suite à la stimulation du récepteur aux cytokines, SHP-2 devient tyrosine-phosphorylée et agit comme une molécule adaptatrice pour recruter Grb2 et Sos, des membres de la voie de signaling Ras/MAPK/ERK. SHP-2 est essentielle pour la phosphorylation de ERK induite par la leptine via Ob-Rb (Bjørnbæk *et al.*, 2000a in Brann *et al.*, 2002).

Par contre, SHP-2 agit comme un régulateur négatif du signaling Ob-Rb en inhibant la transcription médiée par STAT-3 (Carpenter *et al.*, 1998 in Brann *et al.*, 2002). Le rôle précis de SHP-2 dans le signaling de la leptine n'est donc pas encore totalement résolu (Brann *et al.*, 2002).

Néanmoins, sur base des études décrites ci-dessus, on peut conclure que le signaling de la leptine implique des médiateurs pour les voies de transduction JAK/STAT et MAPK/ERK et que SOCS-3 peut servir à limiter l'action de la leptine (Brann *et al.*, 2002).

Chez les mammifères, le variant Ob-Rb est l'isoforme prédominante exprimée dans l'hypothalamus (Dyer *et al.*, 1997a). Ses principaux sites d'expression dans le système nerveux central sont : le noyau arqué (ARC), le noyau hypothalamique dorsomédian (DMH), le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau hypothalamique ventromédian (VMH) et les noyaux hypothalamiques latéraux (LH) (Elmqvist *et al.*, 1998 in Ahima *et al.*, 2000).

Le gène encodant cette forme, chez l'ovin, possède 84 % d'homologie de séquence par rapport à l'humain et 78 % d'homologie par rapport à la souris (Dyer *et al.*, 1997a).

Son expression est plus faible dans les tissus périphériques, où l'isoforme prédominante est Ob-Ra. Celle-ci possède un domaine intracellulaire, inférieur à 30 acides aminés, contenant seulement un des deux domaines de liaison à JAK et, donc, n'activant pas la voie JAK-STAT. De récentes observations ont suggéré que Ob-Ra transduit le signal par l'activation d'une MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) (Tartaglia *et al.*, 1997 in Caprio *et al.*, 2001).

La forme la plus courte du récepteur, Ob-Re, manque du domaine transmembranaire et agit principalement comme transporteur de leptine, notamment à travers la barrière hémato-encéphalique au niveau du plexus choroïde (Sinha *et al.*, 1996). Elle se retrouve aussi dans les ovaires (Karlsson *et al.*, 1997 in Clarke et Henry, 1999) et les testicules (Hoggard *et al.*, 1997 in Clarke et Henry, 1999).

Plusieurs isoformes du récepteur à la leptine ont aussi été détectées dans d'autres tissus. On détecte moins d'Ob-RL dans les tissus adipeux que dans les tissus hypothalamiques, mais l'expression de cette forme du récepteur à la leptine dans les tissus adipeux reflète des mécanismes physiologiques d'autorégulation de la synthèse de leptine. En effet, la leptine exerce un effet de feed-back négatif sur ces récepteurs, car un manque de leptine augmente le taux d'ARNm Ob-RL (Dyer *et al.*, 1997a).

Les récepteurs à la leptine se rencontrent aussi dans l'hypophyse, les cellules épithéliales mammaires, le placenta, l'utérus, les ovaires, les testicules, les cellules T, les cellules endothéliales vasculaires et l'estomac (Chemineau *et al.*, 1999 ; Friedman et Halaas, 1998).

3. Fonctions de la leptine

En 1953, Kennedy propose la théorie lipostatique selon laquelle les tissus adipeux pourraient fournir un signal au système nerveux central, limitant l'appétit des animaux lorsque leur état d'engraissement augmente au-delà d'un certain seuil, permettant ainsi d'éviter les nombreux inconvénients d'une adiposité excessive et impliquant la grande précision des mécanismes qui régulent la composition corporelle à long terme. Ce n'est que plus tard que la leptine sera découverte comme jouant ce rôle essentiel d'informer l'organisme sur le niveau de ses réserves lipidiques.

Chez l'ovine, ainsi que chez beaucoup d'autres mammifères, la leptine est impliquée dans la régulation de l'ingestion alimentaire, l'équilibre énergétique, la thermorégulation, l'activité physique et la reproduction (figure 4).

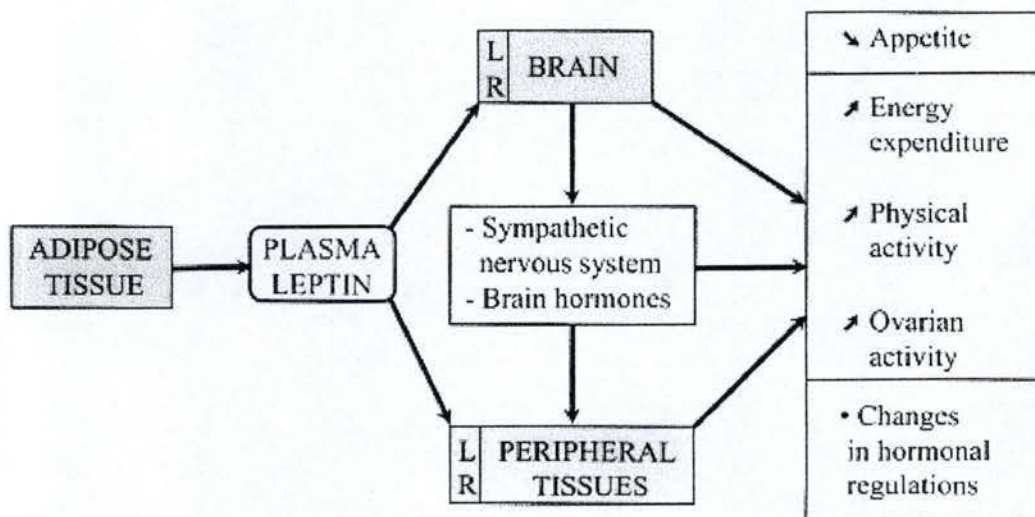


Figure 4 : Les effets physiologiques de la leptine sécrétée par le tissu adipeux chez les rongeurs (Chilliard *et al.*, 2001).

LR = récepteurs à la leptine

3.1.Régulation de l'appétit

De nombreux signaux périphériques contribuent à la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique.

Les mécano- et chémorécepteurs signalant la présence et la densité énergétique de la nourriture dans le tractus gastro-intestinal contribuent à la satiété dans la période post-prandiale immédiate. Les changements dans les concentrations plasmatiques en glucose semblent contrôler l'initiation et la terminaison du repas en régulant l'activité des neurones hypothalamiques spécifiques répondant au glucose (Havel, 2001).

D'autres nutriments, tels que les acides aminés et les acides gras, et des hormones peptidiques du tractus gastro-intestinal, telles que la cholecystokinine, sont aussi impliqués dans la régulation à court terme de la prise alimentaire (Havel, 2001).

Cependant, la densité énergétique de la nourriture et les signaux hormonaux à court terme sont insuffisants pour produire des changements soutenus dans le bilan énergétique et l'adiposité corporelle (Ahima et Flier, 2000).

Ces signaux interagissent avec des régulateurs à long terme, tels que l'insuline et la leptine, pour maintenir l'homéostasie énergétique (Ahima et Flier, 2000).

L'insuline et la leptine sont transportées dans le cerveau où elles modulent l'expression de neuropeptides hypothalamiques connus pour réguler le comportement alimentaire et le poids corporel (Ahima et Flier, 2000).

La leptine inhibe probablement l'appétit et le gain de poids en diminuant l'expression des peptides orexigéniques, tels que le NPY, et en augmentant celle des peptides anorexigéniques, tels que l' α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), la corticotropin-releasing hormone (CRH) et le CART (Ahima et Flier, 2000).

Des données indiquent l'existence d'un mécanisme de feedback à partir du tissu adipeux sur le pancréas endocrine. En effet, il a pu être démontré que le récepteur à la leptine est exprimé dans les cellules- β produisant l'insuline et que la leptine est un potentiel inhibiteur de la libération d'insuline, puisque aussi bien la libération d'insuline basale que celle induite par le glucose sont inhibées par la leptine (Fehmann *et al.*, 1997).

Les concentrations en insuline et leptine circulantes sont proportionnelles à la concentration en graisses corporelles ; cependant, leurs sécrétions et taux circulants sont aussi influencés par l'apport d'énergie récent et la teneur en macronutriments dans l'alimentation. En effet, ils diminuent durant le jeûne et les régimes pauvres en énergie, indépendamment des changements de graisses corporelles (Havel, 2001).

Les graisses alimentaires et le fructose ne stimulent pas la sécrétion d'insuline et la production de leptine. C'est pourquoi, la production atténuée d'insuline et de leptine pourrait mener à une augmentation de l'apport énergétique et contribuer à une prise de poids et à l'obésité durant la consommation à long terme de régimes riches en graisses et/ou fructose (Havel, 2001).

3.2. Rôle dans le métabolisme lipidique

Des expériences ont montré que la leptine influence la répartition des graisses corporelles. Une augmentation rapide du taux de leptine provoque une diminution de l'appétit et une augmentation des dépenses énergétiques, donc une diminution des graisses corporelles (Blum, 1997 ; Iqbal *et al.*, 2000).

En plus de ces effets endocrines sur le cerveau et les tissus périphériques, la leptine pourrait agir par voie autocrine/paracrine sur les tissus où elle a été produite (figure 5).

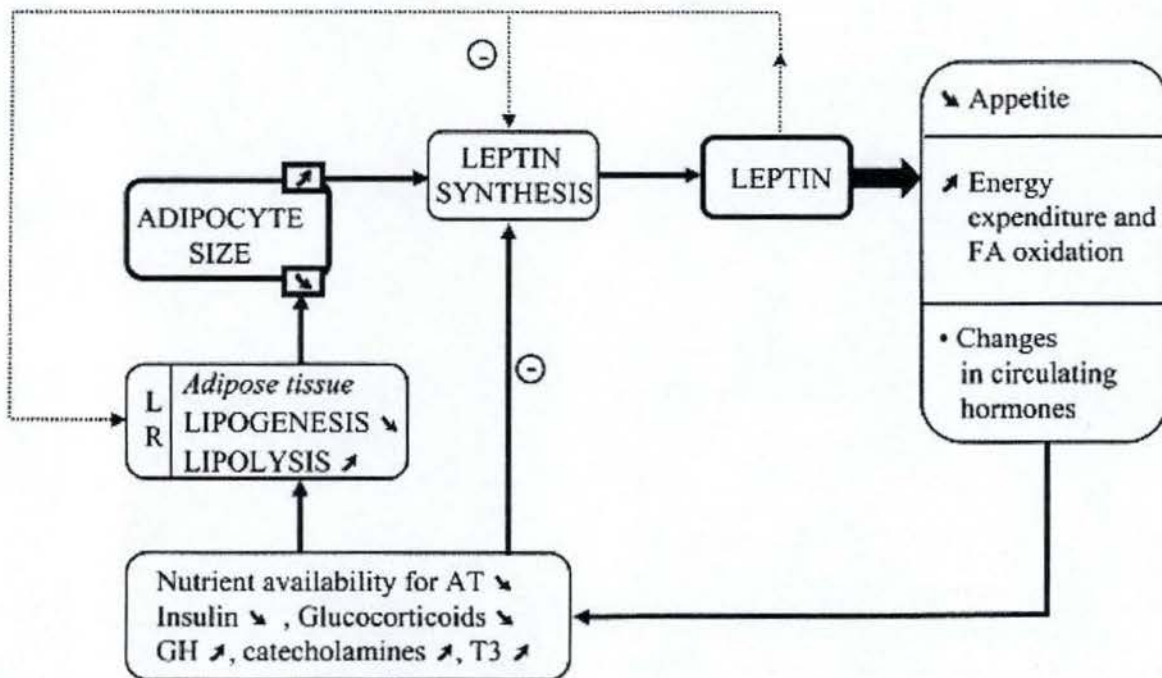


Figure 5 : Boucles de feedback entre la taille des adipocytes, la leptine et le métabolisme énergétique chez les rongeurs (Chilliard *et al.*, 2001).

LR = récepteurs à la leptine
 —> = effets autocrine/paracrine

En effet, un autre effet remarquable de la leptine est sa capacité à améliorer l'homéostasie du glucose quand elle est injectée à des animaux de laboratoire ou insérée par thérapie génique médiée par adénovirus. Sur des cellules en culture, la leptine diminue directement les concentrations en lipides intracellulaires en réduisant la synthèse d'acides gras et triglycérides et, simultanément, en augmentant l'oxydation des lipides. Cet effet sur le métabolisme lipidique peut être médié par un effet inhibiteur de la leptine sur l'activité de l'acétyl Co-A carboxylase, une enzyme limitante dans la synthèse des acides gras. Ces effets directs de la leptine sur le métabolisme lipidique cellulaire sont en accord avec les études menées *in vivo* montrant que la leptine améliore l'homéostasie du glucose (Auwerx et Staels, 1998).

3.3.Reproduction

"Une fonction reproductrice optimale requière un équilibre du niveau de leptine" (Blum, 1997).

La leptine pourrait être un signal métabolique à long terme, dont la diminution stimulerait l'appétit et diminuerait les dépenses énergétiques tout en inhibant la reproduction quand le niveau de réserves corporelles est insuffisant pour assurer une gestation et une lactation. La baisse de leptinémie consécutive à une insuffisance de l'apport alimentaire pourrait également être un signal à court terme pour les systèmes neurohormonaux régulant le métabolisme énergétique et la fonction de reproduction (Chilliard *et al.*, 1999).

Chez les ovins, les variations de la leptinémie dues à la photopériode pourraient jouer un rôle dans l'adaptation aux contraintes environnementales. En effet, en jours courts (stimulation de la reproduction), une faible leptinémie basale pourrait augmenter la sensibilité de l'animal à une diminution des ressources alimentaires, qui abaisserait la leptinémie en-deça d'un seuil critique pour la reproduction. En plus de ce rôle dans la reproduction, la capacité de mobilisation des réserves adipeuses est accrue en jours courts, ce qui permet à l'animal de faire face à une moindre disponibilité des ressources alimentaires (Chilliard *et al.*, 1999).

En jours longs (hors période de reproduction), la leptinémie est augmentée et il y aurait une moindre sensibilité du mécanisme par lequel la leptine régule l'ingestion au niveau cérébral. Cette résistance à la leptine, couplée à une activité lipogénique plus élevée du tissu adipeux pour un niveau donné d'ingestion, peut être considérée comme un mécanisme anticipateur facilitant la reconstitution des réserves lipidiques en période de disponibilité alimentaire élevée (Chilliard *et al.*, 1999).

En outre, la photopériode et le niveau alimentaire induisent des changements dans le taux plasmatiques de prolactine qui pourraient être médiés par la leptine (Bocquier *et al.*, 1998).

3.3.1.Fonction hypothalamo-hypophysaire

Des injections de leptine provoquent, chez des souris ob/ob femelles, une augmentation des concentrations en LH, et chez des souris ob/ob mâles, une augmentation des concentrations en FSH dans le sérum.

Chez des rats femelles adultes normaux, un traitement de huit jours avec un antisérum de leptine provoque une décroissance marquée de l'amplitude du pulse de LH moyen et des taux moyens de LH, mais aucun changement dans la fréquence des pulses de LH (figure 6).

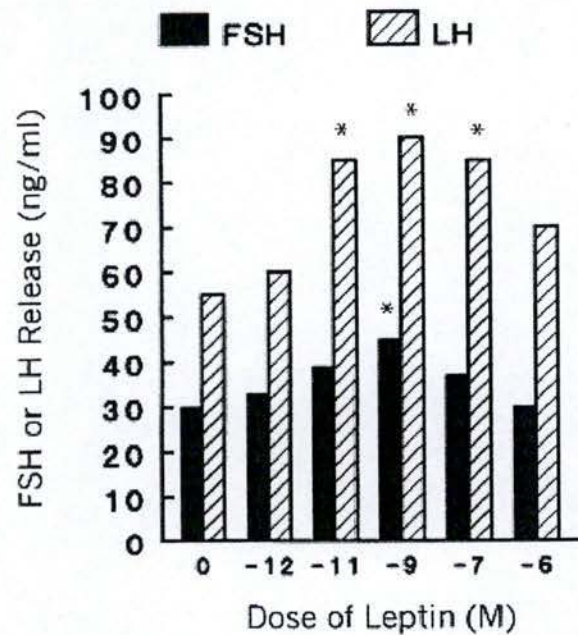


Figure 6 : Effet stimulateur de la leptine sur les sécrétions de LH et FSH par l'hypophyse antérieure du rat (Spicer *et al.*, 2001).

La localisation du récepteur à la leptine dans l'axe hypothalamo-hypophysaire suggère que la leptine joue un rôle neuroendocrine important sur la fonction ovarienne en stimulant la sécrétion des gonadotropines. En effet, la leptine agit soit directement sur les neurones à GnRH, soit indirectement via des interneurones, pour augmenter l'amplitude des pulses de GnRH durant le cycle, augmentant ainsi les sécrétions de LH, FSH et prolactine (Brann *et al.*, 2002).

Des études de double marquage réalisées sur des rongeurs et primates ont permis de démontrer la coexpression des récepteurs au GnRH et à la leptine dans le corps cellulaire des neurones (Finn *et al.*, 1998 in Caprio *et al.*, 2001), tandis que d'autres auteurs disent qu'il y a peu ou pas de co-expression de l'ARNm du récepteur à la leptine dans les neurones à GnRH, suggérant que l'effet de la leptine, s'il y en a, sur les neurones à GnRH est indirect (Spicer, 2001).

L'ARNm du récepteur entier à la leptine est présent dans l'hypophyse du mouton, du porc, de la souris et des rats, suggérant que des effets hypophysaires directs de la leptine peuvent exister (Spicer, 2001).

L'hypothalamus est un des premiers tissus où l'ARNm du récepteur à la leptine a été localisé. Depuis lors, de nombreuses études ont évalué la localisation de l'ARNm du récepteur à la leptine dans l'hypothalamus de plusieurs espèces telles que le mouton, la souris, le rat et l'homme, mais la plupart ont évalué l'effet direct de la leptine sur la fonction hypothalamique *in vitro*. La leptine peut avoir à la fois des effets stimulateurs et inhibiteurs sur la libération du GnRH et ces effets peuvent être dépendants et varier avec les espèces, les conditions de culture et le sexe des espèces (Spicer, 2001).

Aussi, la présence de l'ARNm de la leptine dans l'hypothalamus du rat indique que, comme dans l'hypophyse, la leptine agissant sur l'hypothalamus ne provient pas uniquement de la circulation sanguine (Spicer, 2001).

3.3.2.Apparition de la puberté

La puberté chez les filles commence quand un minimum de masse corporelle ou une certaine quantité de graisse corporelle est présente. Il existe donc un signal par lequel les réserves adipeuses informent l'hypothalamus du degré de réserves énergétiques. La leptine pourrait être le signal, émis par le tissu adipeux, pour déclencher la puberté. Elle a en effet été démontrée comme étant un stimulateur potentiel des sécrétions de gonadotropines. Elle augmente à la fois chez les filles et les garçons avant l'apparition d'autres hormones reproductrices nécessaires pour la puberté (Garcia-Mayor *et al.*, 1997).

La leptinémie chez les humains est similaire dans les deux sexes durant la période prépubertaire (Macut et Micicacute, 1998). Cependant, bien qu'elle augmente avec l'âge jusqu'à 10 ans, la leptinémie chez les garçons est toujours plus faible que chez les filles (Garcia-Mayor *et al.*, 1997).

Après la puberté, l'augmentation de la leptinémie se maintient chez les filles, tandis qu'elle décroît chez les garçons (figure 7).

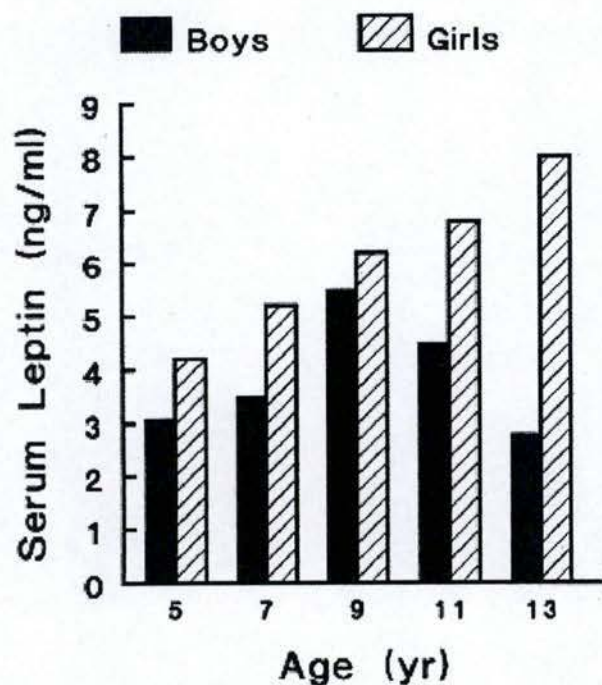


Figure 7 : Changements dans les concentrations en leptine sériques durant la puberté chez l'humain (Spicer *et al.*, 2001).

Chez les filles, il y a d'abord augmentation de leptinémie, suivie par celle de LH et FSH. Chez les garçons, la leptine diminue plus ou moins en même temps que la testostérone augmente, ce qui suggère un effet inhibiteur de la testostérone sur la leptine (Garcia-Mayor *et al.*, 1997).

La leptine peut donc être un facteur nécessaire pour l'initiation des événements de la puberté (Garcia-Mayor *et al.*, 1997).

Les premières indications de l'impact de la leptine sur le déclenchement de la puberté proviennent des observations faites sur des souris ob/ob et db/db qui sont infertiles et présentent une maturation sexuelle anormale due aux altérations de la fonction hypothalamo-hypophysaire. De plus, une restriction alimentaire retarde le déclenchement de la puberté, tandis que la réalimentation abolit ce retard chez le rat (Caprio *et al.*, 2001) et chez l'agneau (Hamidallah *et al.*, 2000).

Chez les mammifères, le dimorphisme sexuel dans les concentrations en leptine devient visible après la puberté. En effet, chez les mâles, la leptinémie augmente au cours de l'enfance, atteint un pic dans les premiers stades de la puberté, puis décline, tandis qu'elle augmente durant le développement pubertaire chez les femelles. Par conséquent, la leptinémie est trois à quatre fois plus élevée chez les femelles que chez les mâles. Cela peut s'expliquer par le fait que, après la puberté, la testostérone sérique et le volume testiculaire sont inversement corrélés avec la leptinémie chez les mâles, tandis que chez les femelles, l'oestradiol est directement corrélé avec la leptinémie. Ces observations indiquent que les stéroïdes sexuels peuvent participer, au moins en partie, aux différences dans les concentrations plasmatiques en leptine (Caprio *et al.*, 2001).

La puberté représente donc un moment critique où le milieu stéroïdien engendre une régulation différente des sécrétions de leptine dans les deux sexes (Caprio *et al.*, 2001).

3.3.3.Fonction ovarienne

De nombreuses preuves indiquent que la leptine a une action directe sur l'ovaire.

Tout d'abord, les cellules ovariennes de la granulosa et de la thèque ont des récepteurs à haute affinité pour la leptine (Spicer, 2001).

Ensuite, l'ARNm du récepteur à la leptine a été identifié dans l'ovaire humain adulte, l'ovaire de rat, les cellules de la thèque et de la granulosa humaines, les ovocytes de souris et l'ovaire de porc (Spicer, 2001).

L'identification de l'expression d'Ob-R dans plusieurs tissus périphériques, tels que les ovaires et les testicules, suggère que la leptine peut avoir un effet direct sur les cibles endocrines en aval de l'axe reproducteur. Plusieurs études se sont focalisées sur les ovaires, où l'expression d'Ob-R est abondante. Des études *in vitro* menées sur des cellules de la granulosa et de la thèque montrent que la leptine a un effet négatif sur la circulation des stéroïdes ovariens, à la fois dans des modèles de rongeurs et de bovins (Spicer et Francisco, 1998 ; Zachow et Magoffin, 1997 in Caprio *et al.*, 2001).

Dans l'ovaire bovin, la leptine s'oppose directement à l'effet stimulateur de l'insuline sur la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa et, en absence d'insuline, la leptine a peu ou pas d'effet sur la stéroïdogenèse de ces cellules (Spicer, 2001).

De plus, la leptine est un inhibiteur potentiel de l'activité aromatasase induite par l'insuline des cellules de la granulosa différenciées ou non (Spicer, 2001).

Il est probable que le récepteur à la leptine dans les cellules de la granulosa peut décroître en même temps que la croissance et le développement des follicules, rendant les follicules de De Graaf matures moins sensibles aux effets négatifs de la leptine (Spicer, 2001).

La FSH est connue pour être nécessaire au recrutement des petits follicules antraux dans la cohorte pré-ovulatoire en croissance. En conséquence à la stimulation FSH, les cellules de la granulosa se différencient en cellules productrices d'oestradiol nécessaire pour la viabilité du follicule. Il existe un groupe de facteurs de croissance intra-ovariens et de cytokines qui modulent la croissance folliculaire dépendante de FSH et la différenciation des cellules de la granulosa. IGF-1 et TGF- β en font partie, car ils stimulent la production d'oestradiol dépendante de FSH. En culture de cellules de granulosa bovines, humaines et ovinnes, la leptine exerce un effet inhibiteur sur la production d'oestradiol dépendante de FSH en supprimant l'effet de sensibilisation à l'insuline et/ou IGF-1 (Zachow *et al.*, 1999).

De plus, le rôle physiologique de la leptine dans les ovaires peut être limité en condition d'obésité. Chez les femmes obèses, le niveau de leptine est suffisant pour interférer avec l'action de IGF-1 et TGF- β sur la production d'oestradiol dépendante de FSH. Par conséquent, un tel effet pourrait inhiber la fertilité puisque la sensibilisation des petits follicules antraux au FSH par les facteurs intra-ovariens est importante pour la sélection des follicules dominants. L'arrêt de la production d'oestradiol durant la croissance folliculaire peut donc provoquer l'atrésie folliculaire. C'est pourquoi, en contrecarrant l'effet de TGF- β dans les cellules de la granulosa, la leptine peut interférer avec un mécanisme essentiel qui promeut la croissance folliculaire et la maturation (Zachow *et al.*, 1999).

La leptine s'oppose aussi directement à l'effet stimulateur de l'insuline sur la stéroïdogenèse des cellules de la thèque chez les bovins (Spicer, 2001).

3.3.4.Cycles reproducteurs femelles

Il y a certaines différences dans les taux de leptine selon la phase du cycle menstruel.

Chez la femme, les taux plasmatiques de leptine en milieu de phase lutéale sont significativement plus élevés que durant la phase folliculaire (Spicer, 2001).

Il a aussi été montré que le pic de leptine est mesuré dans la phase lutéale du cycle et qu'il est corrélé au niveau maximal de progestérone (Macut et Micicacute, 1998).

Des décroissances dans les concentrations en leptine ont aussi été observées après la ménopause (Spicer, 2001).

Les oestrogènes peuvent augmenter la sécrétion de leptine chez les rats (Spicer, 2001).

Cependant, ces changements ne semblent pas être dus aux variations dans les concentrations en oestrogènes et/ou progestérone puisque les stéroïdes sexuels n'ont pas d'effets sur la leptine circulante chez les jeunes femmes ou les femmes ménopausées (Spicer, 2001).

Enfin, il a été montré que l'administration de leptine recombinante à une souris ob/ob peut restaurer la fertilité chez ces animaux infertiles. Il est possible que la leptine puisse agir directement au niveau des ovaires et que l'inhibition d'un tel effet pourrait jouer un rôle dans les irrégularités menstruelles chez les femmes obèses et sous-alimentées (Macut et Micicacuta, 1998).

3.4.Gestation et lactation

Le taux de leptine est plus élevé chez les femmes enceintes que chez les femmes non enceintes (Tableau 1). Cette élévation est indépendante de l'augmentation du poids corporel et de l'adiposité puisqu'elle se produit dès le début de la gestation, bien avant la prise de poids (Brann *et al.*, 2002).

Tableau 1 : Les concentrations en leptine dans le sérum maternel et le liquide amniotique (AF) de femmes enceintes et dans le sérum de femmes non enceintes (groupe contrôle) (Schubring *et al.*, 1999).

	Median	Range	n
leptin concentration (ng/ml) of non-pregnant women	6.2	2.7–55.4	39
leptin concentration (ng/ml) of pregnant women	10.9	3.2– 51.9	62
leptin concentration (ng/ml) in AF ^a	8.7	2.3–30.2	63

AF= amniotic fluid.

Cependant, des données indiquent que les taux de leptine sont corrélés avec le Body Mass Index (BMI), bien que cette corrélation diminue au cours de la gestation (figure 9).

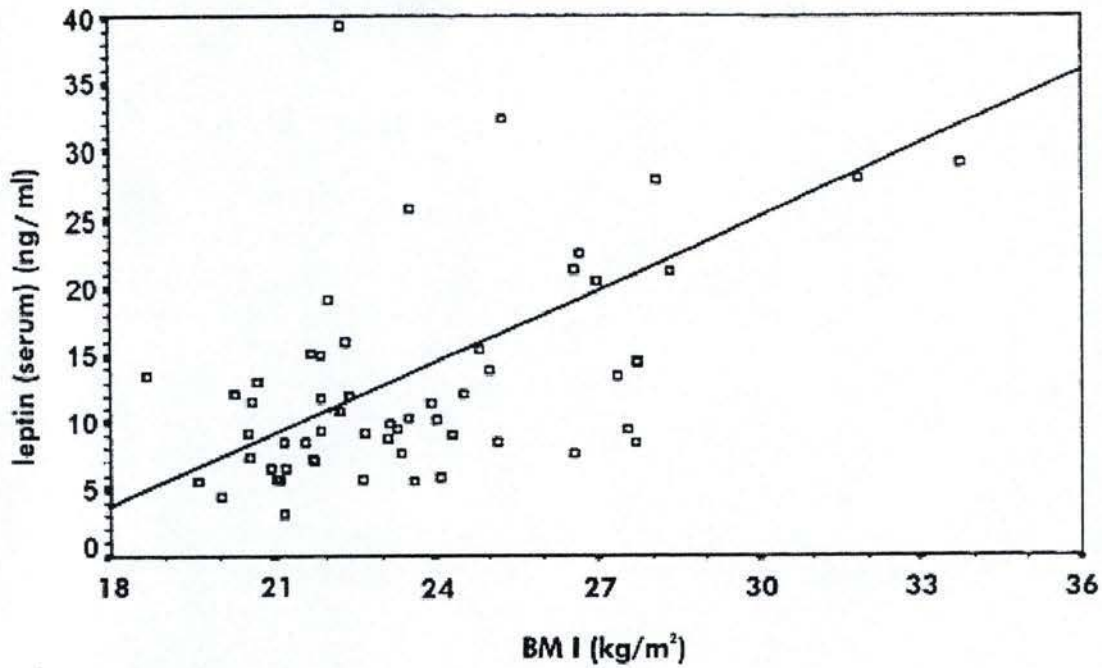


Figure 9 : Corrélation entre les taux de leptine dans le sérum maternel et le body mass index (BMI) (Schubring *et al.*, 1999).

L'ARNm du récepteur à la leptine est exprimé dans les tissus reproducteurs périphériques, les cellules du cumulus des follicules pré-ovulatoires humains, l'ovocyte, le trophoblaste de l'embryon et les cellules trophoblastiques du placenta humain rapidement après la conception, ce qui suggère un rôle de la leptine dans l'implantation (Kitawaki *et al.*, 2000).

Aussi, l'ARNm du récepteur à la leptine augmente de 2,7 fois dans l'utérus durant la gestation chez le rat (Spicer, 2001).

Dans l'endomètre, l'expression de l'ARNm Ob-R augmente dans la phase sécrétoire, c'est-à-dire quand l'endomètre se prépare à accepter l'œuf fécondé. La variation de l'abondance de l'ARNm durant le cycle menstruel peut suggérer que l'expression de ces gènes est régulée par les stéroïdes ovariens (Kitawaki *et al.*, 2000).

Le taux d'expression de l'ARNm de leptine dans les tissus vilieux est augmenté en début de gestation et diminue au cours de la gestation. Donc, dans l'environnement local de l'endomètre, la leptine joue un rôle spécifique, avec d'autres facteurs de croissance et cytokines, dans l'acceptation de l'œuf fécondé et dans les premiers stades du développement humain (Kitawaki *et al.*, 2000).

Le développement de l'hyperlipidémie durant la grossesse indique que la leptine a une fonction importante dans la modulation du partage des nutriments maternels afin d'optimiser l'approvisionnement de nutriments pour la croissance fœtale et le maintien de la gestation.

Cela suggère que, à travers la modulation des sécrétions d'insuline maternelle et le métabolisme hépatique, la leptine intègre le stockage des nutriments maternels et les besoins en nutriments du fœtus. L'importance du placenta comme site de synthèse de leptine et les rôles potentiels de la leptine placentaire ont pu être montrés dans les relations mère-fœtus durant le développement intra-utérin (Holness *et al.*, 1999).

Chez l'humain, la leptine est synthétisée dans le placenta à des taux comparables à ceux de la cellule adipeuse. Elle est localisée dans les cellules cyto- et syncytiotrophoblastiques, qui sont situées sur la face maternelle du placenta, et est libérée principalement dans la circulation maternelle où sa concentration devient maximale au deuxième trimestre de la grossesse pour décroître quelques heures après la délivrance (Hauguel de Mouzon et Lepercq, 2001).

Le transfert des nutriments de la mère au fœtus et la synthèse et la sécrétion d'hormones placentaires sont médiés par la couche de cellules épithéliales du syncytiotrophoblaste dans le placenta. La localisation de la leptine dans le syncytiotrophoblaste confirme l'importance potentielle de la leptine dans la coordination du métabolisme placentaire et l'entretien des besoins nutritionnels du fœtus (Holness *et al.*, 1999).

Outre sa présence dans le placenta, la leptine est aussi détectée dans le liquide amniotique (voir tableau 1) et le plasma fœtal dès la dix-huitième semaine d'aménorrhée (Hauguel de Mouzon et Lepercq, 2001).

Cependant, des données suggèrent que les taux de leptine maternelles ne sont pas corrélés aux taux de leptine dans le liquide amniotique, mais dérivent de différentes sources (Schubring *et al.*, 1999).

Chez le nouveau-né, la leptinémie est positivement corrélée au poids de naissance, ce qui suggère que l'adipocyte fœtal détermine la leptinémie fœtale sans exclure une participation placentaire. Les oestrogènes, le stress hypoxique et l'insuline sont les principaux facteurs susceptibles d'augmenter la production placentaire de leptine. La leptine libérée dans la circulation maternelle pourrait aussi participer à la régulation de l'homéostasie énergétique de la mère. La leptine placentaire peut agir localement en activant des voies de signalisation recrutées par des récepteurs placentaires spécifiques (Hauguel de Mouzon et Lepercq, 2001).

Chez les ovins, la leptine est détectée dans le placenta, mais l'expression du gène de la leptine y est négligeable. Cependant, l'expression du gène codant pour le récepteur à la leptine a été détecté dans le placenta ovin, suggérant que celui-ci est un organe cible pour la leptine (Thomas *et al.*, 2001).

Le taux élevé d'expression de la leptine et de son récepteur dans le squelette fœtal suggère un rôle de la leptine dans le développement des os et du cartilage ou dans l'ossification et l'hématopoïèse durant le développement intra-utérin (Holness *et al.*, 1999).

En plus de son rôle dans la gestation, la leptine peut aussi jouer un rôle régulateur dans les événements postpartum tels que la lactation. La leptine et les formes courtes et longues de son récepteur sont exprimées dans les cellules épithéliales mammaires ovines durant la lactation. Une corrélation inverse entre les taux de leptine et prolactine suggère que la leptine peut affecter la production de lait chez l'homme, indirectement via son effet négatif sur les taux de prolactine (Brann *et al.*, 2002).

De plus, la lactation chez le rat est caractérisée par la suppression de la sécrétion pulsatile de LH, une grande augmentation dans la prise alimentaire et des changements dans le bilan énergétique dus au métabolisme de la production de lait. Le changement dans le bilan énergétique peut être un composant majeur dans la fonction reproductive. De nombreux facteurs peuvent contribuer au changement de ce bilan chez un animal en lactation, dont la leptine. Plusieurs expériences ont permis de montrer que le taux de leptine diminue significativement, aussi bien chez des femelles en lactation ovariectomisées qu'entières. Cette diminution est parallèle à la suppression de la sécrétion pulsatile de LH. Le taux sérique d'insuline n'est pas altéré chez les animaux en lactation (Brogan *et al.*, 1999).

Le gène de la leptine est exprimé dans les tissus mammaires des bovins, ovins et caprins lactants. Dans le tissu mammaire ovin, l'expression du gène de la leptine ainsi que de son récepteur change considérablement au cours de la gestation et de la lactation. La détermination quantitative du taux d'ARNm, par real-time RT-PCR, montre que l'expression de la leptine est la plus élevée durant la première moitié de la gestation et moins marquée avant la parturition, tandis que le taux d'ARNm du récepteur à la leptine est le plus élevé entre 70 et 106 jours de gestation (Chilliard *et al.*, 2001).

La leptine, au stade protéique, a été détectée par analyse immunohistochimique dans les adipocytes mammaires durant les premiers stades de la gestation, dans les cellules épithéliales, et principalement sur leur membrane apicale, juste avant la parturition et dans les cellules myoépithéliales durant la lactation, tandis que l'ARNm du récepteur à la leptine a été exclusivement localisé, par hybridation in situ, dans les cellules épithéliales (figure 10).

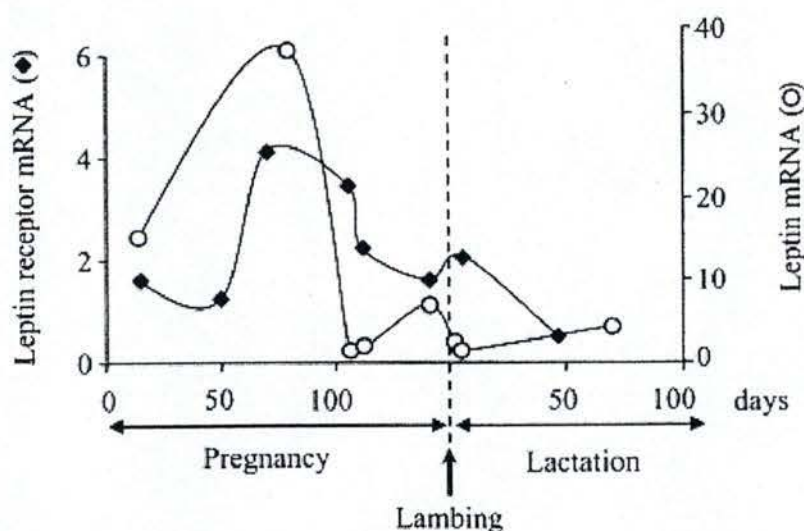


Figure 10 : Taux d'ARNm de leptine mammaire et de son récepteur au cours de la gestation et la lactation chez la brebis (Chilliard *et al.*, 2001).

La synthèse de leptine par les adipocytes mammaires au début de la gestation suggère que la leptine pourrait jouer un rôle paracrine dans la prolifération et/ou la différenciation des cellules épithéliales qui expriment fortement le récepteur à la leptine à ce stade (Chilliard *et al.*, 2001).

La croissance et le développement de la glande mammaire durant la gestation sont hautement dépendants des hormones stéroïdes et protéiques dérivées des ovaires, du placenta et de la glande hypophysaire (Chilliard *et al.*, 2001).

Cependant, des études *in vitro* indiquent que ces effets hormonaux sont indirects et médiés par des facteurs de croissance synthétisés par les adipocytes mammaires. Il est tentant d'émettre l'hypothèse que la leptine pourrait être une de ces protéines inductibles par ces stéroïdes et synthétisée par les cellules graisseuses mammaires (Chilliard *et al.*, 2001).

En réalité, la forte expression du gène de la leptine, à 80 jours de gestation, coïncide avec l'augmentation de la concentration en oestradiol dans le plasma (Chilliard *et al.*, 2001).

En fin de gestation, chez la brebis, quand le tissu adipeux mammaire a complètement régressé, la synthèse de leptine semble être d'origine locale, puisque la diminution de l'expression du gène codant pour le récepteur à la leptine dans les cellules épithéliales pourrait réduire son transfert à partir de la circulation sanguine via ces cellules (Chilliard *et al.*, 2001).

Bien que les rôles respectifs de ces deux processus, sanguin et local, restent à déterminer, ils peuvent être responsables de la présence de leptine dans le lait de vache et de brebis (Chilliard *et al.*, 2001).

De plus, comme cela a été suggéré chez la souris, l'augmentation de l'expression d'ARNm de la leptine et de son récepteur au moment de la parturition peut expliquer la sécrétion de la leptine protéique, accumulée sur la membrane apicale des cellules épithéliales, dans le colostrum (Chilliard *et al.*, 2001).

La leptine, en tant que protéine du colostrum, peut alors promouvoir l'immunité et la fonctionnalité des cellules intestinales, comme cela a pu être observé chez la souris (Chilliard *et al.*, 2001).

Finalement, après la parturition, la leptine est présente dans les cellules myoépithéliales et pourrait être exclusivement produite par ce type cellulaire (Chilliard *et al.*, 2001).

La leptine a été détectée dans le lait humain et ovin. La leptine maternelle peut jouer un rôle régulateur important via l'allaitement du jeune, en affectant la croissance et la prise de nourriture (Brann *et al.*, 2002).

3.5.Système immunitaire

La leptine sert de lien entre l'état nutritionnel et le système immunitaire puisqu'elle stimule la prolifération des cellules TCD4⁺ et augmente la production de cytokines par les cellules Thelper-1 (Friedman et Halaas, 1998).

De plus, la leptine joue un rôle dans l'immunité innée et acquise. Le taux de leptine augmente subtilement durant l'infection ou l'inflammation et peut représenter un composant protecteur de la réponse de l'hôte à l'inflammation. Plus important, une déficience en leptine augmente la susceptibilité aux stimuli infectieux et inflammatoires et est associée à une dérégulation de la production de cytokines. Une déficience en leptine altère l'hématopoïèse (Faggioni *et al.*, 2001).

Enfin, la leptine régule les réponses des cellules T, polarisant les cellules Th vers un phénotype Th1. Chez l'homme soumis à la famine, les faibles taux de leptine mesurés pourraient médier les dysfonctionnements neuroendocriniens et immuns observés (Faggioni *et al.*, 2001).

4.Modèles *in vivo* de déficience, résistance et excès de leptine

L'existence d'un modèle animal ayant une mutation homozygote du gène ob est un outil intéressant pour l'étude des messages biochimiques entre les réserves de graisses et l'axe reproducteur (Caprio *et al.*, 2001).

Chez les souris ob/ob, le gène ob codant pour la leptine est muté. La mutation consiste en un remplacement d'une arginine par un codon stop prématuré et il en résulte la production d'une forme inactive de la leptine. Ces souris sont alors obèses, diabétiques et stériles. Le même phénotype est observé chez des souris db/db, ayant un défaut dans le gène db codant pour le récepteur à la leptine et donc, résultant en un transcrit prématurément tronqué du récepteur à la leptine (Chemineau *et al.*, 1999 ; Dyer *et al.*, 1997a ; Pelleymounter *et al.*, 1995).

Chez les souris ob/ob, l'administration de leptine provoque un gain de poids de l'utérus et des ovaires chez les femelles ; des vésicules séminales et testicules chez les mâles ; et restaure la fertilité chez les deux sexes. Inversement, la restriction calorique ne restaure pas la fertilité chez les souris ob/ob, suggérant que l'obésité n'est pas la cause d'infertilité chez ces souris, et que la leptine est directement liée aux modifications de capacité reproductive.

Par contre, chez les souris db/db, le traitement à la leptine est incapable de modifier l'appétit des animaux ou de restaurer la fertilité puisque le défaut se situe au niveau du récepteur (Caprio *et al.*, 2001).

Des mutations des gènes codant pour la leptine et son récepteur ont aussi été découvertes chez les humains, et ceux-ci présentent des caractéristiques phénotypiques similaires à celles montrées chez la souris (Caprio *et al.*, 2001).

La disponibilité d'un modèle murin avec des taux de leptine augmentant chroniquement a aussi apporté de nouvelles connaissances quant au rôle joué par la leptine dans la reproduction. Avec de hautes concentrations en leptine, les souris femelles transgéniques maigres présentent une puberté précoce et une fertilité intacte aux début, suivies, plus tard, par un hypogonadisme hypothalamique caractérisé par un oestrus prolongé, des ovaires atrophiés et une sécrétion de GnRH et LH réduite. L'hyperleptinémie *in vivo* semble faciliter le démarrage de la puberté mais, si elle persiste chroniquement, peut, plus tard, interférer avec les signaux centraux de la leptine qui stimulent la fonction reproductive ou avec la stimulation gonadotrophique des cibles périphériques (Caprio *et al.*, 2001).

5. Régulation de l'expression et des voies métaboliques de la leptine

Afin de comprendre le rôle régulateur de la leptine, il est important de définir les facteurs environnementaux et génétiques contribuant à la variabilité du taux basal d'ARNm et de leptine plasmatique (figure 11).

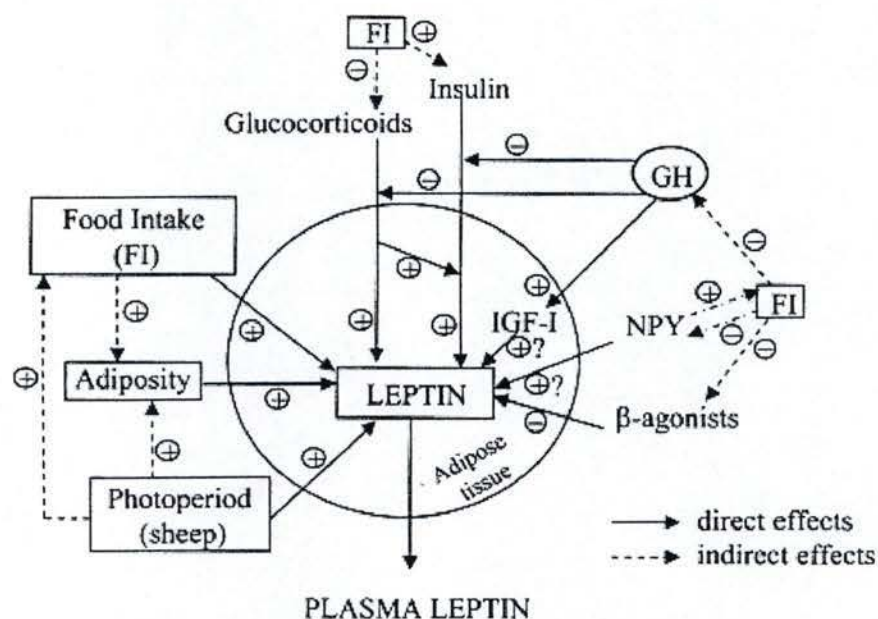


Figure 11 : Régulation de la leptine chez les ruminants (Chilliard *et al.*, 2001).

5.1.Neuromédiateurs

L'action de la leptine passe, probablement, par des neuromédiateurs tels que le NPY (neuropeptide protéique hypothalamique Y), la POMC (pro-opiomélanocortine), la sérotonine ou la galanine (Steiner *et al.*, 1999).

En effet, l'existence d'une coexpression abondante de Ob-R par les neurones POMC, NPY et AgRP (Agouti-related peptide) dans le noyau arqué du rat a pu être montrée (Cheung *et al.*, 1997 in Caprio *et al.*, 2001).

De plus, chez les souris ob/ob, la leptine induit l'expression de POMC dans le noyau arqué et inhibe l'expression de galanine dans le noyau périventriculaire, suggérant des rôles modulateurs importants de ces neuropeptides dans l'action de la leptine sur le cerveau (Steiner *et al.*, 1999).

Aussi, l'analyse de la neurochimie et des phénotypes comportementaux des souris portant des délétions du NPY et de la galanine suggère que les neurones exprimant ces deux neuropeptides servent comme éléments d'une voie métabolique parallèle, pour la régulation de la nutrition, du métabolisme et de la reproduction, probablement en modulant la sensibilité de ces processus à l'action de la leptine (Steiner *et al.*, 1999).

Le NPY est un régulateur potentiel de la nutrition et de la reproduction. Il est surexprimé dans l'hypothalamus d'animaux surnourris ou génétiquement obèses, c'est un puissant stimulateur de l'appétit et un régulateur de la libération de LHRH (Dyer *et al.*, 1997b ; Dyer *et al.*, 1997c ; Niimi *et al.*, 2001).

La leptine diminue l'expression du NPY hypothalamique, mais celle-ci est aussi régulée par l'insuline et, indirectement, par l'effet stimulateur de l'insuline sur l'expression de la leptine. Back. Dans la voie métabolique insuline-leptine-NPY, il existe donc toute une série de feed-back, importants pour maintenir un équilibre entre nutrition, corpulence et fertilité (Dyer *et al.*, 1997b, Dyer *et al.*, 1997c).

Inversement, le NPY régule la production d'insuline dans le pancréas et donc régule directement, positivement ou négativement, l'expression de la leptine (Dyer *et al.*, 1997c).

La régulation de l'activité des neurones à LHRH par la leptine passe par les neurones à NPY. Cependant, une inactivation du gène NPY n'empêche pas la reproduction. Cela suggère que d'autres voies sont empruntées par la leptine pour agir sur la libération de LHRH (Chemineau *et al.*, 1999).

L'expression de POMC est réduite de 50% chez les souris ob/ob et l'administration de leptine restaure l'expression de l'ARNm codant pour POMC. Les actions inhibitrices de la leptine sur la prise alimentaire sont principalement médiées par des signaux transduits par les récepteurs aux mélanocortines, en particulier par les isoformes neuronales prédominants : les récepteurs MC3 et MC4. Les souris et les humains déficients en POMC sont hyperphagiques, obèses et résistants à la leptine. L'antagonisme de la mélanocortine centrale réalisé par surexpression du peptide AgRP, antagoniste du récepteur MC, ou par injection d'un antagoniste synthétique, produit un phénotype similaire (Caprio *et al.*, 2001).

De plus, une mutation des gènes encodant les récepteurs MC3 et MC4 augmente la masse de graisses et cause l'obésité chez la souris ; des études chez les humains indiquent qu'il y a une prévalence élevée de mutation du récepteur MC4 ($\cong 4\%$) dans une population humaine obèse. Ces observations suggèrent que la leptine peut modifier la fonction reproductrice en modulant la disponibilité de la protéine POMC dans le cerveau (Caprio *et al.*, 2001).

Le peptide CART a été récemment découvert comme étant un inhibiteur endogène de la prise alimentaire régulée par la leptine et médiant l'accélération de la sécrétion pulsatile de GnRH (Caprio *et al.*, 2001).

5.2.Effets de la photopériode et du niveau alimentaire

Les ovins sont sensibles à la longueur du jour ; la reproduction est stimulée par une photopériode courte, et la consommation de nourriture est maximale en photopériode longue.

Chez des brebis placées en jours courts, le taux de leptine plasmatique et l'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux diminuent. Cet effet direct de la photopériode sur le taux de leptine et sur le métabolisme tissulaire est indépendant du niveau alimentaire, de l'état d'engraissement, des changements dans le métabolisme intermédiaire tel que l'insulinémie ou la glycémie, et de l'activité ovarienne (Bocquier *et al.*, 1998 ; Chilliard *et al.*, 1999).

Les réserves lipidiques et, de façon moindre, les apports alimentaires, sont les facteurs contribuant le plus aux variations de la leptinémie. Chez les ovins, la leptinémie et le taux d'ARNm de leptine dans les tissus adipeux sont diminués lors d'une sous-alimentation et réaugmentent lors de la réalimentation (Chilliard *et al.*, 1999).

Chez les brebis sous-alimentées, le taux de leptine plasmatique et le taux d'ARNm diminuent même s'il n'y a pas de modification de la masse et de la taille des adipocytes (Bocquier *et al.*, 1998). En effet, une réduction de la prise alimentaire provoque une baisse de l'insulinémie et une hypoleptinémie. Celle-ci sert de signal informant l'organisme d'un état de sous-alimentation (Chilliard *et al.*, 1999).

Le taux d'ARNm pour la leptine et la leptinémie sont donc augmentés par la réalimentation et la photopériode longue (Chilliard *et al.*, 1999).

Aussi, chez l'homme et le rat, la sécrétion de leptine se fait selon un rythme circadien : elle est maximale entre 22h00 et 3h00, et minimale entre 8h00 et 17h00. De plus, elle est libérée sous forme pulsatile avec une fréquence de 32 pulses en 24h. Ce mode de sécrétion pulsatile est synchronisé avec celui de la LH (Luteinizing hormone) (Licinio *et al.*, 1998 in Caprio *et al.*, 2001).

Aussi, cette élévation nocturne des concentrations en leptine pourrait être due, au moins en partie, à une augmentation des sécrétions de prolactine durant la nuit. Celle-ci agit probablement sur ses récepteurs adipocytaires pour stimuler une libération rapide de leptine à partir de ces cellules (Mastroradi *et al.*, 2000).

Bien que certains animaux saisonniers peuvent présenter des rythmes saisonniers endogènes du poids corporel et de l'alimentation en absence de signes environnementaux, pour d'autres, des signaux photopériodiques appropriés sont requis pour les changements saisonniers (Mercer, 1998).

La mélatonine, une hormone pinéale, coordonne le timing des adaptations saisonnières. La sécrétion nocturne de mélatonine constitue un signal permanent lié à la longueur de la phase sombre des cycles de jour/nuit naturels ou artificiels (Mercer, 1998).

Les cycles saisonniers du poids corporel et de l'appétit sont d'un intérêt particulier car, selon les espèces et leur stratégie pour survivre aux cycles annuels du climat et de la disponibilité en nourriture, l'appétit, le poids corporel et l'adiposité peuvent être altérés d'une façon non-pathologique dans chaque direction (Mercer, 1998).

L'implication de la prolactine, de l'insuline et de la tyrosine ont été étudiées, mais la perte de poids induite en jours courts pourrait ne pas être attribuée uniquement aux taux de ces hormones (Mercer, 1998).

L'intérêt d'une perte de poids en jours courts est probablement d'avoir une masse métabolique réduite qui requière moins d'énergie pour l'entretien à une période où la nourriture est rare (Mercer, 1998).

5.3. Insuline, glucocorticoïdes, GH

Chez les ovins, la production de leptine est stimulée par les glucocorticoïdes et l'insuline, dont les effets sont inhibés par la GH.

Les concentrations en glucose et en insuline augmentent lors de la réalimentation, mais ne sont pas affectées par la photopériode (Chilliard *et al.*, 1999 ; Houseknecht *et al.*, 2000).

L'effet de la leptine sur la reproduction semble impliquer le métabolisme intracellulaire dépendant de la disponibilité des combustibles métaboliques périphériques. En effet, chez des hamsters à jeûn traités avec du 2-deoxyglucose, un inhibiteur compétitif de l'utilisation du glucose, l'administration de leptine ne restaure que partiellement l'activité oestrale cyclique. Il semble donc que la leptine ne soit pas capable de restaurer la sécrétion de gonadotropines quand le manque de combustibles métaboliques est amplifié par un inhibiteur de l'utilisation des combustibles métaboliques périphériques. Donc, les actions centrales de la leptine sur la capacité reproductive peuvent agir de concert avec d'autres signaux métaboliques, tels que la disponibilité en glucose, pour réguler l'activité neuronale du GnRH (Caprio *et al.*, 2001).

La connexion fonctionnelle entre le pancréas endocrine et le tissu adipeux est bien caractérisée. L'insuline est un stimulateur potentiel de l'apport de glucose dans les adipocytes, elle amplifie donc la lipogenèse. De plus, l'insuline augmente l'expression du gène de la leptine chez l'humain, et donc des taux plasmatiques de leptine (Fehmann *et al.*, 1997).

L'insuline régule la synthèse et la sécrétion de leptine via un mécanisme post-transcriptionnel. Des données suggèrent que la stimulation des sécrétions de leptine par l'insuline se fait selon deux voies. La première voie, majeure, est l'augmentation de la leptine intracellulaire qui semble sortir de la cellule. La seconde, mineure, est la sécrétion d'un pool de vésicules contenant la leptine (Bradley *et al.*, 2001).

Le traitement de moutons ou bovins en croissance par la GH augmente le taux d'ARNm de leptine dans le tissu adipeux. Cet effet de la GH *in vivo* sur l'expression de leptine pourrait être une partie du mécanisme de feedback négatif de la GH. *In vitro*, la leptine diminue la stimulation des sécrétions de la GH par la GnRH au niveau des cellules hypophysaires ovines (Chilliard *et al.*, 2001).

Cependant, *in vivo*, des injections de leptine augmentent la concentration de GH plasmatique chez des moutons en restriction alimentaire (Chilliard *et al.*, 2001).

Les glucocorticoïdes stimulent l'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux et des effets positifs additifs sont observés pour l'insuline et les glucocorticoïdes sur le tissu adipeux de rat (Considine et Caro, 1997 in Houseknecht *et al.*, 2000).

Par ailleurs, on constate une augmentation de la synthèse de leptine au niveau du tissu adipeux en culture *in vitro* lors de l'ajout simultané d'insuline et de dexaméthasone. Ensemble, ces résultats suggèrent que ces deux hormones agissent par différents mécanismes (Etherton et Bauman, 1998 in Houseknecht *et al.*, 2000).

5.4. Autorégulation

Une augmentation de la production de leptine suite à l'augmentation de la taille des cellules adipeuses et/ou de la quantité de lipides corporels, se traduit par une diminution de la quantité de nutriments disponibles pour les tissus adipeux et par des modifications hormonales qui diminuent la lipogenèse et la synthèse de leptine et/ou augmentent la lipolyse de ces tissus (Chilliard *et al.*, 1999).

Donc, la leptine inhibe la lipogenèse et stimule la lipolyse, tout en freinant sa propre production. Cela permet d'éviter des fluctuations trop brutales du système (Chilliard *et al.*, 1999).

5.5. Stéroïdes sexuels

Les concentrations en leptine dans le sang des femmes maigres et obèses se situent dans la gamme de 2 à 10 ng/ml et de 10 à 100 ng/ml respectivement (Spicer, 2001).

Les taux de leptine, mesurés par la technique R.I.A., sont de 1.5 à 7.5 ng/ml chez le mouton (Chilliard *et al.*, 2001).

La synthèse de leptine est plus grande dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral et les concentrations en leptine circulante plus élevées chez les femelles sont probablement dues, en partie, à une proportion plus grande de graisses sous-cutanées (Ahima et Flier, 2000).

Les androgènes et oestrogènes n'ont pas d'effets directs sur la production de leptine par le tissu adipeux *in vitro* (Kristensen *et al.*, 2000).

De plus, *in vivo*, la substitution d'oestrogènes et/ou progestérone chez des rats ovariectomisés n'affecte pas la concentration en leptine circulante, ni son expression dans le tissu adipeux. Il est donc improbable que les stéroïdes jouent un rôle majeur dans sa régulation (Luukkaa *et al.*, 2001).

Cependant, une étude menée sur des rats indique que l'administration de 17- β oestradiol augmente le niveau d'ARNm de leptine dans le tissu adipeux. Le 17- β oestradiol pourrait donc réguler l'expression du gène de la leptine et sa sécrétion chez le rat femelle, montrant donc un effet anorectique possible des oestrogènes (Brann *et al.*, 1999).

En effet, des études montrent que les taux plasmatiques de leptine plus élevés chez les femmes résultent, en partie, de l'inhibition par les androgènes et la stimulation par les oestrogènes (Ahima et Flier, 2000).

Les stéroïdes agissent donc directement sur la leptinémie et indirectement, en modifiant la répartition des graisses.

5.6. Facteurs génétiques

Le clonage et la caractérisation du promoteur du gène de la leptine ont permis la mise en évidence de régions régulatrices impliquées dans l'expression du gène spécifique du tissu adipeux (Auwerx et Staels, 1998).

L'expression du gène de la leptine est régulée, de façon opposée, par PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) et C/EBP α (CCAAT/Enhancer Binding protein- α), deux facteurs de transcription contrôlant la différenciation des adipocytes (Auwerx et Staels, 1998).

L'expression du gène leptine est induite par C/EBP α et cet effet est médié par un site de liaison à C/EBP α dans le promoteur proximal du gène leptine. Par contre, les ligands et activateurs de PPAR γ diminuent l'expression de leptine par un effet direct sur son promoteur (Auwerx et Staels, 1998).

Donc, PPAR γ ne semble pas uniquement favoriser la différenciation des adipocytes au niveau local, mais aussi induire une réponse systémique consistant en une diminution des taux de leptine et une augmentation associée de la prise alimentaire, qui fournira les substrats pour être stockés dans ces adipocytes (Auwerx et Staels, 1998).

De plus, POMC est un précurseur de l'hormone adrénocorticotrope qui régule la production des glucocorticoïdes, et est connu pour réguler l'expression du gène leptine (Auwerx et Staels, 1998).

Chapitre II :

Objectifs poursuivis

L'objectif de cette étude est d'aborder deux aspects différents de l'influence de l'état corporel et du niveau alimentaire sur le système reproducteur de la brebis.

Tout d'abord, nous nous intéresserons aux effets à long terme de l'alimentation, susceptible de modifier l'état corporel (BCS ou Body Condition Score) et d'agir sur la fertilité.

Le deuxième aspect concerne la technique de flushing utilisée chez les ovins. Il s'agit d'augmenter le taux d'ovulation et de diminuer le taux de mortalité embryonnaire en donnant un supplément alimentaire pendant une courte période juste avant et après la période de reproduction (effet dynamique de l'alimentation).

Nous étudierons donc l'effet du niveau alimentaire et de l'état corporel sur la fertilité de brebis adultes et sur divers paramètres influençant cette fertilité :

- le taux d'ovulation,
- le taux plasmatique de la leptine et d'autres hormones,
- l'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux,
- la localisation du récepteur à la leptine au sein du tissu adipeux, de l'ovaire et de l'utérus.

Pour évaluer l'influence de l'état corporel et du niveau alimentaire sur la fertilité, trois groupes de brebis ont été suivis à l'approche de la saison de reproduction. Un groupe a été nourri *ad libitum*, la cote BCS à viser étant de 2,5 à 3. Les deux autres ont reçu une ration ne couvrant pas leurs besoins le temps d'atteindre un état d'embonpoint inférieur au premier groupe et obtenir une cote de 1 à 2 lors de la mise à la reproduction. Un de ces deux groupes a ensuite reçu un supplément alimentaire selon les modalités du flushing tel qu'il est pratiqué en élevage ovin. Une étude de différentes méthodes d'insémination a été couplée à notre expérience. Les résultats seront mis à profit dans le cadre de ce travail puisqu'ils permettront d'étudier la fertilité des brebis dans les trois groupes.

L'évolution de ces trois groupes a pu être suivie grâce à des pesées, à l'attribution d'une cote BCS selon la méthode de cotation utilisée pour la race ovine, comme elle est décrite dans l'article de Thompson et Meyer (1994) et des prises de sang effectuées pendant toute la période expérimentale. Les paramètres de reproduction ont pu être étudiés grâce à diverses techniques. Le taux d'ovulation de chaque groupe a été estimé en dénombrant les corps jaunes sur les ovaires par la technique d'endoscopie. Les taux plasmatiques de leptine et d'autres hormones en relation avec celle-ci telles que la FSH, la LH et l'oestradiol ont été mesurés par Radio Immuno Assay. Le tissu adipeux a été prélevé par biopsie tissulaire sur un échantillon d'animaux dans les trois groupes afin d'étudier l'expression du gène de la leptine et ce, à l'aide des techniques d'extraction de l'ARN, de RT-PCR semi-quantitative et d'électrophorèse sur gel d'agarose.

Ces techniques étant déjà maîtrisées par le laboratoire, elles ont néanmoins nécessité une adaptation à notre expérience. Une technique de RT-PCR quantitative compétitive a été mise au point afin d'estimer de façon plus précise cette expression du gène de la leptine. Le contrôle de la quantité d'ARN compétiteur de départ présente un avantage par rapport à la méthode semi-quantitative. De plus, l'utilisation d'un compétiteur homologue, créé à partir de la séquence d'ARN cible, constitue un avantage par rapport à l'utilisation d'un compétiteur hétérologue puisqu'elle minimise la différence dans l'efficacité d'amplification.

La mise au point de cette technique a constitué la plus grande partie de ce travail. Un chapitre entier lui sera donc consacré. L'ADN compétiteur obtenu par transcription *in vitro* a été séquencé afin de vérifier qu'il s'agissait bien de la séquence attendue. Les résultats obtenus par cette technique ont été analysés grâce à un logiciel d'analyses d'images et ont ensuite été comparés à ceux obtenus par l'analyse semi-quantitative.

Enfin, une première approche de l'étude immunohistochimique du tissu adipeux, des ovaires et de l'utérus a été réalisée afin de mettre au point une technique visant à déterminer, ultérieurement, la localisation des récepteurs de la leptine. Pour ce faire, une brebis et une ratte ont été sacrifiées afin de prélever les ovaires, l'utérus et du tissu adipeux.

Chapitre III :

*Mise au point d'une
technique de RT-PCR
quantitative compétitive*

1.Principe d'une RT-PCR

La PCR a prouvé son utilité dans l'analyse de l'expression de gènes grâce à la RT-PCR et l'amplification de fragments d'ADN correspondant à des ARNm spécifiques. Mais, la détermination relative ou absolue du nombre de copies peut être difficile à cause des variations dans l'efficacité d'amplification obtenue entre échantillons, ces variations étant dues, notamment, à la longueur de l'ADN à amplifier, à la séquence de l'ADN à amplifier, à la séquence des primers utilisés ou encore à la phase plateau due à l'épuisement des matériaux de la PCR qui donne une efficacité nulle.

La quantité d'ARN total obtenu après extraction peut être estimée par les valeurs d'absorbance (A260). Les échantillons d'ARN bruts sont souvent utilisés en RT-PCR. L'ARN cible est une sous-population de l'ARN total estimé par les valeurs d'absorbance. De plus, des contaminants d'ADN et/ou de l'ARN dégradé ne sont pas rares. C'est pourquoi, les valeurs d'absorbance, A260, ne peuvent pas être utilisées pour comparer exactement la quantité d'ARN cibles dans les échantillons d'ARN bruts.

Les études d'expression de gènes par RT-PCR font souvent référence à un contrôle externe, tel que la β -actine, pour corriger les erreurs dues aux facteurs sus-cités et rendre compte des différences dans la quantité d'ARN.

Un contrôle négatif (blanc), est réalisé pour chacun des échantillons afin d'exclure toute présence d'ADN contaminant. Celui-ci subit les réactions de RT-PCR en même temps que les échantillons, mais n'est pas traité avec la reverse transcriptase.

La réaction de reverse transcription s'effectue avec des '*random primers*'. On obtient donc de l'ADNc total.

2.Principe d'une RT-PCR semi-quantitative

Une méthode semi-quantitative est utilisée pour l'étude de l'expression des gènes par RT-PCR. Celle-ci consiste à amplifier un gène de référence, appelé '*housekeeping gene*', connu pour être exprimé à un niveau constant dans la plupart des tissus. Un des standards externes couramment employés et qui est utilisé dans cette expérience est l'ARNm de β -actine. L'intensité de l'ADN de leptine est comparée à celle de la β -actine sur gel et permet d'estimer les différences de taux d'expression de la leptine entre échantillons.

Cependant, il ne s'agit que d'une approche semi-quantitative de l'expression de gènes, puisqu'elle ne permet pas de quantifier l'expression du gène cible. De plus, ces '*housekeeping genes*' montrent une variabilité d'expression dans certaines conditions expérimentales.

3.Principe d'une RT-PCR quantitative compétitive

Pour quantifier l'expression de l'ARNm de la leptine dans le tissu adipeux de mouton, un protocole de RT-PCR compétitive avec un standard interne a été mis au point. La méthode utilisée s'inspire de celle fournie avec le kit 'RT-PCR Competitor Construction Kit' de chez Ambion. Il ne s'agit pas d'une réelle compétition dans le sens biochimique du terme puisque tous les réactifs sont en excès, mais d'une compétition entre des brins d'ADNc différents mais s'hybridant avec les mêmes primers pour l'amplification. Il s'agit en réalité d'une compétition cinétique. En effet, plus la concentration en standard interne est élevée, plus la probabilité que les primers s'hybrident à ce standard plutôt qu'à l'ADN cible est élevée.

Ce standard, aussi appelé ARN compétiteur, est ajouté à une quantité définie d'échantillons d'ARN pour la réaction de RT. Le standard ADNc résultant est coamplifié avec les mêmes primers que la cible endogène. Cette méthode permet ainsi de mesurer de petites différences dans la quantité d'ARNm entre les échantillons.

La quantité initiale du compétiteur étant connue, la quantité de l'ARN cible peut donc être estimée selon le rapport T/C, où T est la quantité de produits amplifiés à partir de l'ARN cible et C est la quantité de produits amplifiés à partir du compétiteur. Quand le rapport $T/C = 1$, la quantité initiale de l'ARN cible correspond en théorie à la quantité d'ARN compétiteur ajouté au départ.

Les compétiteurs, dont la séquence dérive de la séquence cible endogène, ont pour avantage d'avoir des efficacités de rétro-transcription et d'amplification équivalentes à la cible endogène puisque les sites de liaison des primers sont identiques et la réaction se déroule dans le même tube.

Après vérification, la méthode de RT-PCR semi-quantitative que nous avons utilisée ne semble pas avoir été remise en cause dans les conditions telles que celles de notre expérience, mais nous avons voulu nous en assurer en utilisant une autre méthode plus quantitative et plus sûre.

4.Mise au point de la technique

4.1.Synthèse du compétiteur par RT-PCR et transcription in vitro

Une représentation schématique de la création du template compétiteur et des sites de liaison des primers utilisés dans la RT-PCR compétitive est montrée à la figure 12 .

Il est essentiel que le produit PCR issu de l'amplification de l'ARN compétiteur soit distinguable du produit PCR issu du messager endogène.

La méthode employée dans ce travail a été d'incorporer, lors de l'amplification PCR, une délétion dans le domaine amplifié du template. L'ADNc délété obtenu doit ensuite être transcrit pour synthétiser l'ARN compétiteur.

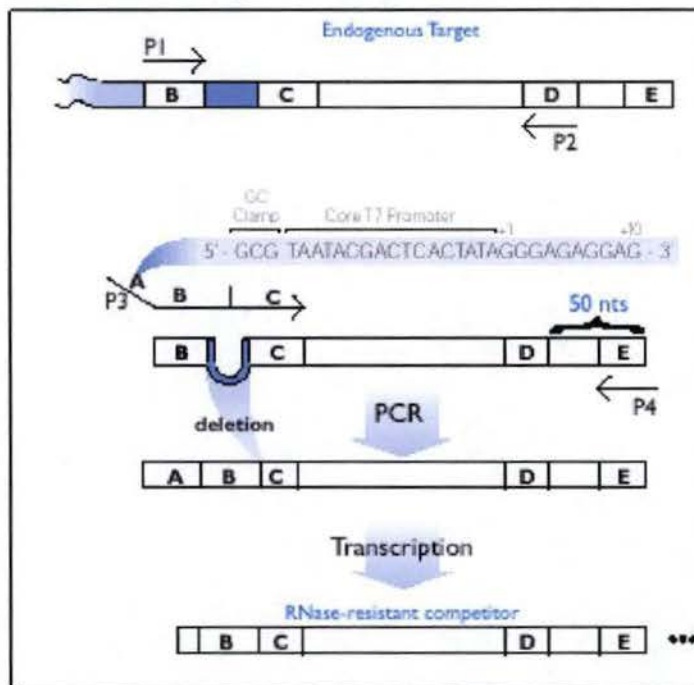
Une première réaction de RT-PCR est effectuée sur de l'ARN total extrait d'un échantillon de tissu adipeux ovin. La délétion est incorporée dans le template lors de l'amplification PCR en utilisant les primers P3 et P4 (figure 12).

Le primer P3, long de 70 bases, contient la séquence promotrice T7 nécessaire pour la réaction de transcription ultérieure. La petite séquence GCG incluse à l'extrémité 5' du promoteur T7 a pour effet de stabiliser le domaine promoteur et ainsi, fournir une efficacité de transcription plus élevée. Une séquence de 10 nucléotides termine ce primer, la transcription étant initiée au nucléotide G considéré comme site +1. De plus, cette séquence contient uniquement des G et A puisque l'efficacité de transcription est compromise si des C et U, utilisés pour faire le compétiteur d'ARN, sont incorporés dans les 10 premiers nucléotides.

Les régions B et C du primer P3 (figure 12) font respectivement 18 et 22 bases et flanquent la région qui sera délétée. Lors de l'amplification PCR, le primer P3 sert d'oligonucléotide délété. En effet, il s'hybride à la séquence en créant une boucle, un morceau d'ADN auquel ne correspond aucune base complémentaire sur le primer P3, et qui ne sera donc pas amplifiée avec le reste de la séquence. Aussi, la région B présente la même séquence que le primer P1 utilisé pour la réaction de RT-PCR compétitive.

Le primer P4 a été choisi 50 nucléotides plus loin que le primer P2 qui sera utilisé pour l'amplification dans la RT-PCR compétitive. En effet, il semblerait que les compétiteurs ayant une séquence terminale de 50 nucléotides ou plus à l'extrémité 3' sont rétro-transcrits aussi efficacement que l'ARNm cible. Donc, l'ADN template encode au moins 50 nucléotides en aval du primer PCR 3'.

Competitor Construction



Competitive RT-PCR

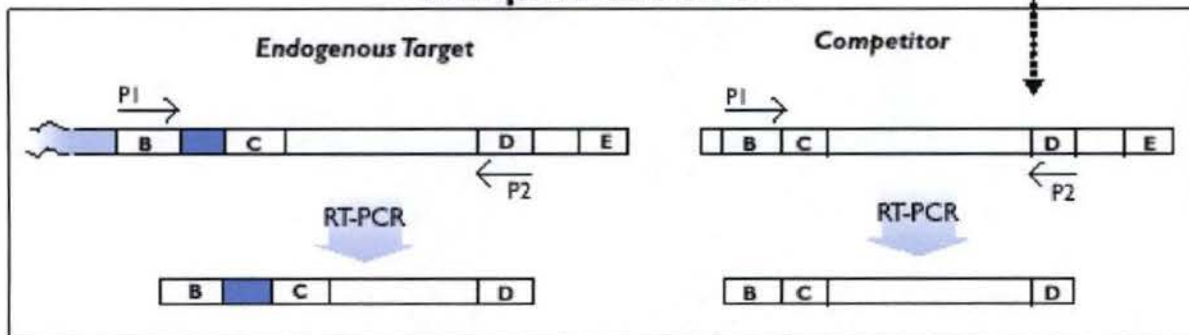


Figure 12 : Schéma représentant la méthode utilisée pour la synthèse du compétiteur.

(http://www.ambion.com/techlib/prot/bp_1356.pdf)

Les primers P3 et P4 utilisés pour la synthèse de l'ARN compétiteur ont donc été créés à partir de la séquence de leptine ovine de façon à incorporer une délétion de 18 bases (= 10%). De plus, ceux-ci ont été choisis en tenant compte des critères, cités ci-dessus, nécessaires pour permettre une transcription in vitro du template, ainsi qu'une bonne efficacité de RT-PCR compétitive. Ils ont ensuite été testés par le programme 'Primerfinder' (<http://eatworms.swmed.edu/tim/primerfinder/>) afin de vérifier leur compatibilité au point de vue température de melting et exclure toutes possibilités de formation de 'hairpin' ou de dimères d'amorces.

Primer P3 :

A
B
C

5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGGACATCTCACACACGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTTCA-3'

Température de melting = 82,3°C

A : séquence promotrice T7

B : région de même séquence que l'amorce P1

C : région flanquant la délétion

Primer P4 :

5'-TGCGGCAAGGGGCAGCTC-3'

Température de melting = 70,5°C

Séquence leptine ovine (U62123) :

```

1  GACACCAAAA CCCTCATCAA GACGATTGTC ACCAGGATCA ATGACATCTC ACACACGCAG
61  [TCCGTCTCCT CCAAAACAG] AG GGTCACTGGC TTGGACTTCA TCCCTGGGCT CCACCCTCTC
    délétion
121 CTGAGTTTGT CCAAGATGGA CCAGACATTG GCAATCTACC AACAGATCCA CGCCAGTCTG
181 CCTTCCAGAA ATGTGATCCA AATATCTAAT GACCTGGAGA ACCTCCGGGA CCTTCTCCAC
241 CTGCTGGCGG GCTCCAAGAG CTGCCCCTTG CCGCAGGTCA GGGCCCTGGA GAGCTTGGAG
301 AGCCTGGGCG TCGTCCTGGA AGCCTCCCTC TACTCCACAG AGGTTTTAGC

```


Le produit de l'amplification PCR est mis à migrer sur un gel d'agarose. On obtient un fragment de leptine ovine de 245 bp correspondant à la séquence 43-275 de la séquence de 350 nucléotides de la leptine ovine à laquelle on ajoute les 30 nucléotides de la séquence T7 et soustrait les 18 nucléotides délétés. L'ADN est purifié à partir du gel d'agarose, puis dosé au spectrophotomètre.

L'ADNc du compétiteur doit être transcrit afin de constituer un pool d'ARN qui est alors dosé au spectrophotomètre, additionné de RNase inhibitor pour éviter sa dégradation pendant le stockage et les manipulations, puis stocké à -80°C en attendant d'être utilisé pour la RT-PCR compétitive. La délétion incorporée dans le template d'ADN génère, par transcription in vitro, un ARN compétiteur d'environ 10% plus court que l'ARN d'intérêt et donc, permet de les distinguer sur gel d'électrophorèse sans modifier son comportement dans la réaction de RT-PCR. Une partie de l'ARN compétiteur obtenu est mis à migrer sur un gel d'agarose-formaldéhyde en présence d'un étalon d'ARN pour vérifier sa présence et sa taille. La taille de l'ARN attendue est de 245 pb.

4.2.RT-PCR quantitative compétitive

Les primers P1 et P2 utilisés dans la réaction RT-PCR compétitive sont les mêmes que ceux utilisés pour l'amplification de la leptine ovine dans la réaction de PCR semi-quantitative. Ces primers serviront également à l'amplification de la leptine ovine et du compétiteur pour la PCR compétitive.

Dans une RT-PCR compétitive, la rétro-transcription et l'amplification du compétiteur et de l'ARN d'intérêt s'effectuent dans le même tube. Des quantités croissantes de compétiteur sont ajoutées à des aliquotes d'un échantillon d'ARN ; ces mélanges sont alors soumis à RT-PCR. Quand des quantités égales de produit PCR sont obtenues à la fois à partir du compétiteur et de la cible d'ARN endogène, on peut dire que le nombre de copies initiales de l'ARN cible dans l'échantillon égale la valeur connue du compétiteur ajouté.

Comme le niveau d'expression d'un gène dans un échantillon expérimental est inconnu, plusieurs dilutions logarithmiques de compétiteur doivent être ajoutées à chaque échantillon d'ARN avant RT-PCR pour obtenir une estimation du nombre de copies.

Pour ce faire, une première expérience 'pilote' a été réalisée. Des réactions de RT-PCR ont été faites sur des aliquotes de compétiteur diluées afin d'obtenir les concentrations suivantes : 2 ng, 20 pg, 2 pg, 200 fg et combinées à une quantité standard, 2 μg , du même échantillon d'ARN. Les produits PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose. La gamme de dilutions du compétiteur correspondant à une quantité similaire de produit PCR d'ARN cible devient la base de l'expérience suivante.

Une seconde RT-PCR est alors réalisée en répétant l'expérience avec des dilutions du compétiteur couvrant une gamme plus étroite et plus de points de dilution intermédiaires : 62 pg, 31 pg, 15.15 pg, 7.75 pg, 3.375 pg.

La quantité d'ADNc dilué doit pouvoir couvrir largement tous les essais pour l'ensemble des analyses. Il est important de travailler avec des dilutions provenant d'un même pool afin de minimiser les imprécisions dues au pipettage, au transfert et au dosage de l'ADNc de départ et ainsi, permettre la comparaison des échantillons entre eux.

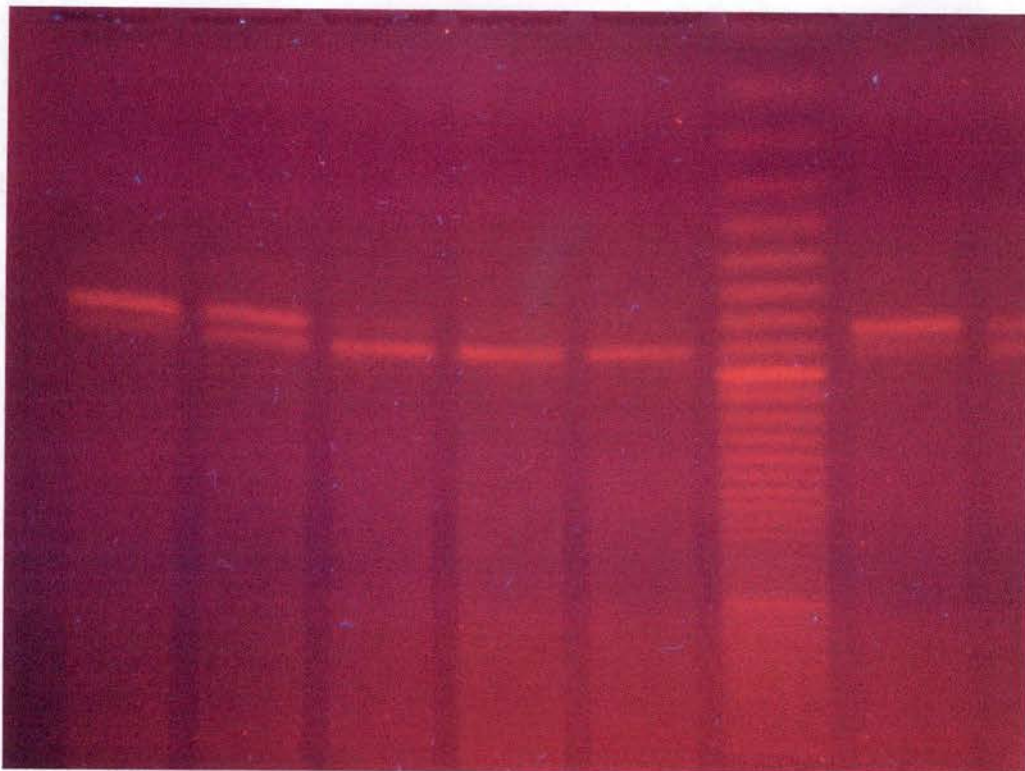


Figure 13 : photographie du gel sur le transilluminateur.

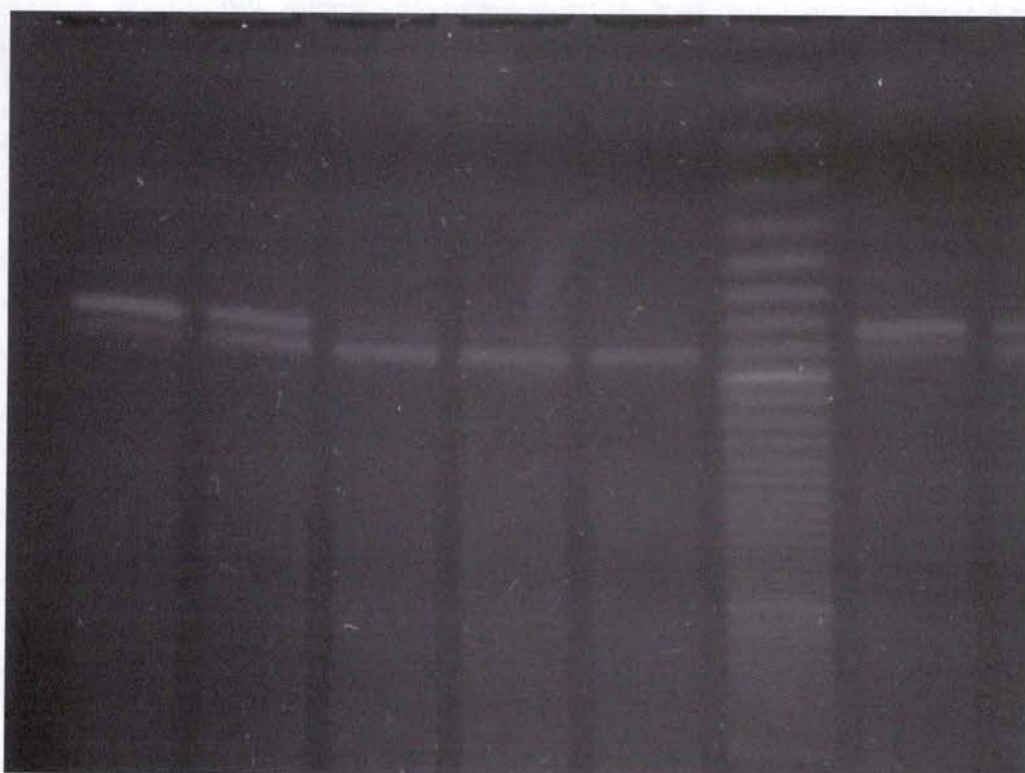


Figure 14 : image obtenue après suppression des couleurs.

Un contrôle négatif, non traité avec la reverse transcriptase, est aussi soumis à RT-PCR afin d'exclure toute présence d'ADN contaminants.

Les produits PCR sont ensuite mis à migrer sur un gel d'agarose concentré à 3%, car les bandes d'ADN compétiteur et celles de l'ADN cible ont une taille très proche et sont donc plus difficiles à séparer sur le gel. L'ADN compétiteur est attendu à 165 bp, tandis que l'ADN cible est attendu à 183 bp.

4.3. Analyse des résultats

Afin de procéder à l'analyse des résultats, le gel est photographié sur le transilluminateur avec un appareil numérique (NIKON Coolpix 990, 3.34 Mega Pixels, programmé en qualité FINE) et analysé avec le programme d'analyse d'image 'NIHimage' : (<http://rsb.info.nih.gov/nihimage/manual/faq.html#mem>).

A partir des résultats de la PCR compétitive, la quantité initiale d'ARN cible peut être estimée à partir du rapport T/C (T= quantité d'ADN cible amplifié ; C= quantité de compétiteur amplifié). En déterminant la quantité de compétiteur qui donne un rapport T/C = 1 pour chaque échantillon, les quantités relatives d'ARN cibles peuvent être obtenues.

Pour chaque échantillon, un graphe est réalisé avec en abscisse le $\log(T/C)$ et en ordonnée la quantité initiale du compétiteur. La quantité initiale de compétiteur correspondant au $\log(T/C)=0$ peut être déterminée pour chaque échantillon à partir de la droite reliant les cinq points de compétition.

A. Photographie numérique du gel :

Le gel est photographié sur le transilluminateur (Figure 13) et l'image est chargée sur un ordinateur.

B. Transfert de l'image :

L'image est modifiée à l'aide du logiciel 'Adobe Photoshop 5.5' afin de supprimer les informations de couleurs, de diminuer la taille de l'image et d'enregistrer l'image en format TIFF de façon à la rendre compatible avec le programme NIH (Figure 14).

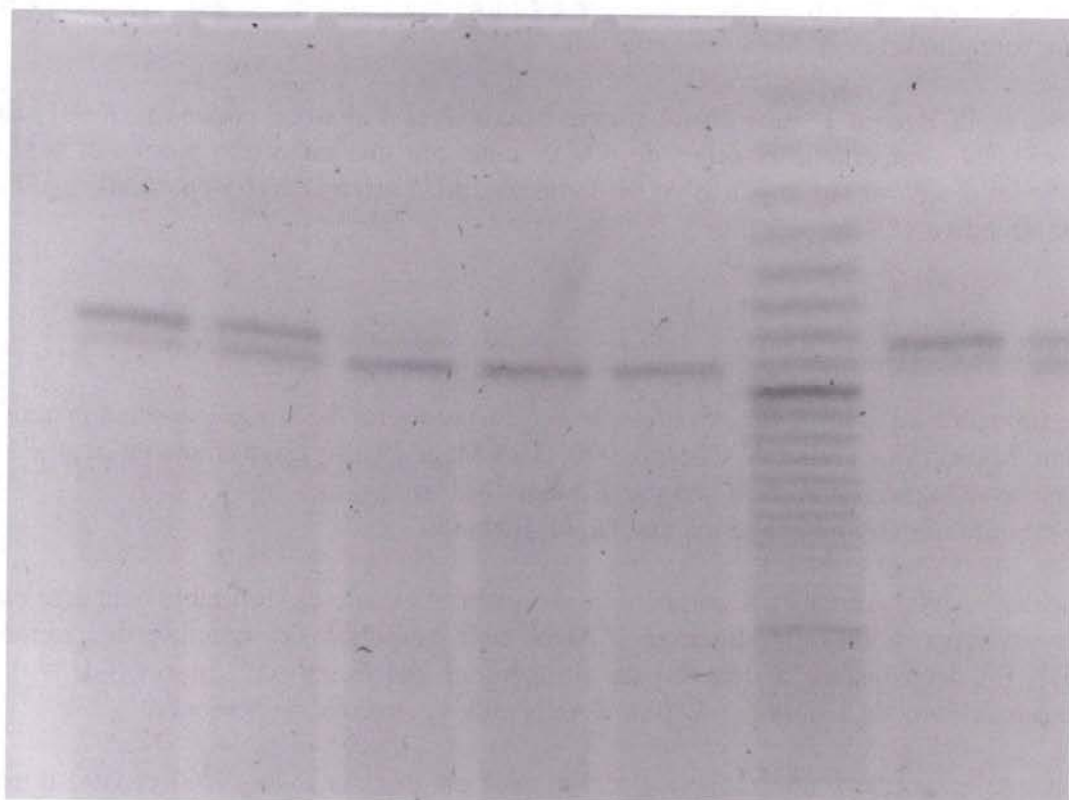


Figure 15 : image en noir sur fond blanc.

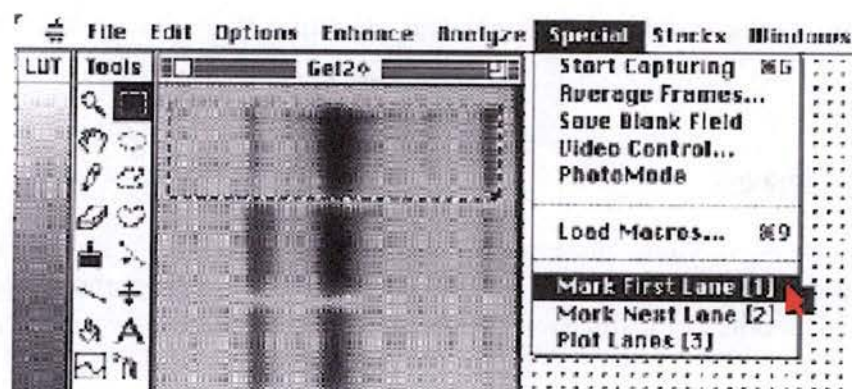


Figure 16 : image avec rectangles de sélection.

C. Analyse de l'image :

Le logiciel NIH travaille avec le négatif de la photo numérique en noir et blanc. La fonction 'invert' permet d'obtenir des bandes noires sur fond blanc (Figure 15).

On sélectionne ensuite des rectangles d'image contenant la bande d'ADN à analyser (Figure 16).

L'ordinateur traduit la bande sélectionnée en courbe de densité optique (Figure 17).

On délimite alors les surfaces sous la courbe à analyser. L'ordinateur mesure l'aire sous la courbe de chaque zone indiquée. Le résultat est une série de mesures d'aires par ordre de sélection. Le tableau 2 représente les aires sélectionnées, correspondant à l'ADN compétiteur de gauche à droite sur la photo, puis celles de l'ADN de la leptine de gauche à droite sur la photo.

Tableau 2 : mesure des aires sous chacune des courbes.

	ADN compétiteur (=C)	ADN cible (=T)
1	1890	401
2	1524	827
3	183	1273
4	105	1296
5	44	1201

Ces données peuvent être automatiquement annotées sur la graphe.

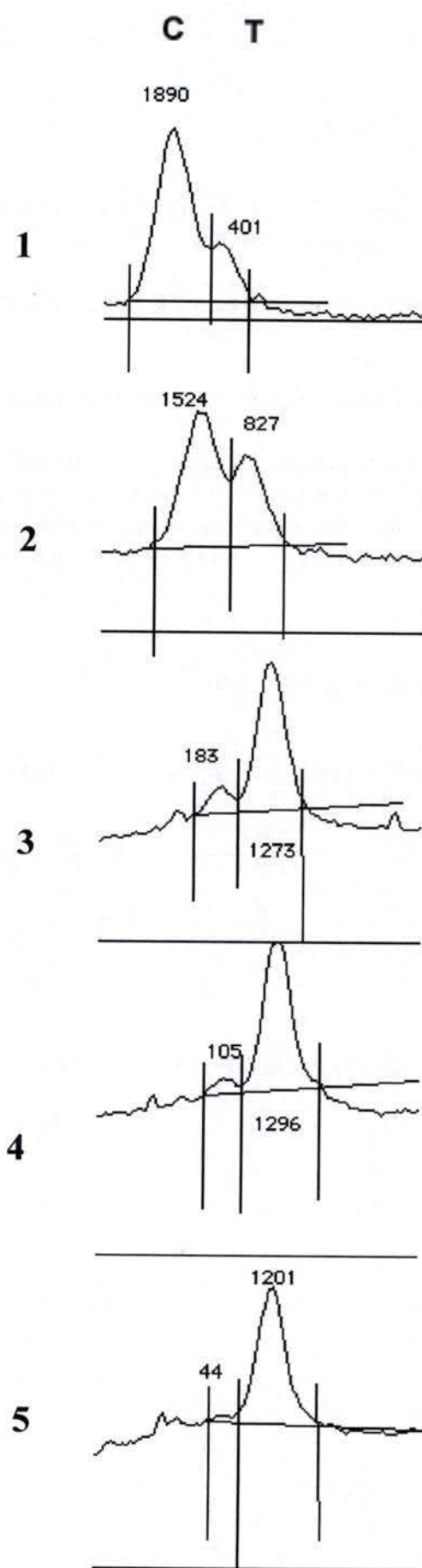


Figure 17 : courbes de densité optique obtenues à partir des sélections.

On remarque une décroissance de l'ADN compétiteur et une augmentation de l'ADN de leptine correspondant à une décroissance de la concentration en ARN compétiteur de gauche à droite sur la photo. L'inverse se produit pour l'ADN de leptine selon la loi de la compétition.

D.Calcul du rapport (T/C) :

Le rapport (T/C) est calculé et transformé en logarithme (tableau 3).

Tableau 3 : calcul du rapport (T/C).

Conc. en ARNco(pg)	Rapport (T/C)	Log(T/C)
62	0.212	-0.673
31	0.543	-0.265
15.15	6.956	0.842
7.75	12.343	1.091
3.375	27.295	1.436

Les données sont introduites dans le programme 'Excel' afin de réaliser un graphe avec en abscisse le logarithme de la concentration en ARN compétiteur et en ordonnée le logarithme du rapport (T/C) (figure 18). Les points obtenus permettent de tracer une droite de régression linéaire dont l'équation permet de calculer la concentration en ARN compétiteur pour laquelle le rapport (T/C) = 1.

L'équation de la droite de régression est :

$$Y = aX + b$$

Il suffit de remplacer y par 0 et on obtient la valeur de x dont le logarithme inverse correspond à la concentration en ARN cible. Dans ce cas, la concentration en ARN de leptine de départ est de 28.2 pg.

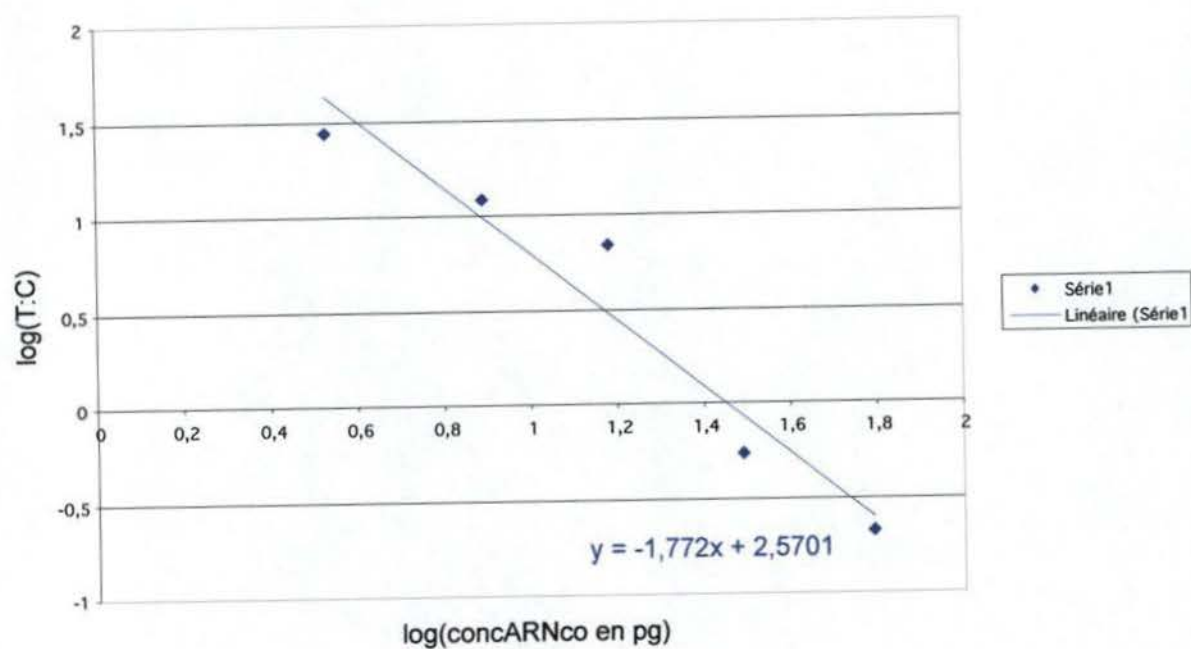


Figure 18 : logarithme du rapport (T/C) en fonction du logarithme de la concentration en ARN compétiteur de départ en pg.

Chapitre IV :

Matériel et méthodes

1. Plan expérimental

La partie expérimentale a été réalisée au Centre de Recherches Ovines des FUNDP à Faulx-les-Tombes. Les animaux choisis sont des brebis de races pures, Texel et Suffolk, ou croisées avec du sang laitier ou Ile de France et dont l'âge varie entre 3 et 6 ans.

L'expérience débute en juin 2001 et se termine fin octobre 2001.

Le mardi 26 juin : un groupe de 74 brebis est réparti en 2 groupes homogènes au niveau condition corporelle et âge. Le groupe 1 comprend 25 brebis nourries *ad libitum*. Le groupe 2 comprend 49 brebis soumises à une sous-alimentation. A ces deux groupes sont ajoutées neuf brebis de réforme afin d'augmenter le nombre d'animaux dans chaque groupe. Les brebis sont pesées et cotées pour estimer leur état corporel.

Le vendredi 6 juillet : les brebis sont pesées et 5 ml de sang sont prélevés à chaque brebis.

Le mardi 14 août : les brebis sont pesées, cotées et 5 ml de sang sont prélevés. Les brebis reçoivent une injection de 7.5 mg de prostaglandines naturelles (Dinolitic*).

Le mardi 24 août : 24 brebis sont retirées du groupe 2 pour constituer un troisième groupe (restriction/flushing). Ces brebis reçoivent un supplément journalier d'avoine (400 g/brebis) distribué en prairie jusqu'à la fin de l'expérience.

Le vendredi 27 août : les brebis nourries à volonté sont pesées.

Le mercredi 12 septembre : les brebis sont pesées, cotées et 5 ml de sang sont prélevés. Les brebis reçoivent une seconde injection de 7.5 mg de prostaglandines naturelles (Dinolitic*).

Le lundi 24 septembre : un bélier vasectomisé marqué à la craie est introduit dans chacun des trois groupes.

Le mercredi 26 septembre : les brebis marquées sont inséminées avec du sperme prélevé au C.I.S.O.. Les brebis de réforme ne sont pas inséminées, on relève uniquement la date de la saillie par le bélier vaso.

A partir du mardi 2 octobre : des endoscopies sont effectuées sur 10 brebis de chaque groupe inséminées 6 jours plus tôt. Les biopsies de tissu adipeux sont réalisées sur 6 brebis de chaque groupe. Les béliers vaso sont remplacés par des béliers entiers qui sailliront les brebis qui n'auront pas été fécondées lors de l'insémination.

Le 17 octobre : l'expérience prend fin. Les brebis sont regroupées et retournent à une alimentation habituelle.

Fin octobre : des échographies de gestation sont effectuées afin de déterminer le nombre de jeunes.

Une brebis et une ratte ont été sacrifiées au mois d'avril afin de prélever les ovaires, l'utérus et du tissu adipeux en vue de mettre au point une technique d'immunohistochimie destinée à mettre en évidence les récepteurs de la leptine.

2. Techniques de base

2.1. Alimentation

Le groupe 1 (volonté) est nourri *ad libitum*. Il est mis dans des prairies où l'herbe est dense et changé avant que l'herbe ne soit rasée. Lorsque les conditions climatiques sont défavorables et l'herbe pauvre, un complément de concentré est donné.

Le groupe 2 (restriction) est mis sur prairie déjà broutée jusqu'à ce que l'herbe soit rasée et est maintenu dans cette prairie jusqu'à la fin de l'expérience.

Le groupe 3 (restriction/flushing) est traité comme le groupe 2 jusqu'au 24 août, date à laquelle les brebis subissent un flushing et sont donc alors traitées comme le groupe 1. Il reçoit chaque jour un supplément d'avoine (400 g/brebis) distribué en prairie.

2.2. Pesées

Les brebis sont pesées à l'aide d'une balance spéciale pour ovins.

2.3. Estimation de l'état corporel

La méthode de cotation consiste en une technique de palpation manuelle au niveau de la colonne vertébrale et sur les côtes, au niveau des reins et immédiatement derrière la dernière côte (Thompson et Meyer, 1994). La brebis reçoit une cote allant de 1 à 5. La cote 1 indique que la brebis est émaciée, sur le point de mourir, la cote 2 que la brebis est maigre, la cote 3 que la brebis a un état corporel normal, la cote 4 que la brebis est grasse et la cote 5 que la brebis est obèse.

2.4. Prises de sang

Les prises de sang sont effectuées en intra-jugulaire à l'aide d'une aiguille de 19 G. Le sang est récupéré dans un tube en polystyrène contenant 2 gouttes d'héparine (Novo, 5000U/ml). Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 3000 rpm et le plasma est stocké dans des tubes numérotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.Endoscopies

Afin de déterminer le taux d'ovulation des brebis et de comparer ce taux entre les 3 groupes expérimentaux, des endoscopies ont été pratiquées sur 10 brebis des différents groupes au jour 6 post-insémination.

L'endoscopie est l'examen d'un organe interne qui s'effectue à l'aide d'une fibre optique. Bien que l'ovaire soit un organe aisé à observer via cette technique, la technique requiert une pratique fréquente afin de pouvoir interpréter correctement les observations.

La méthode est la suivante : la brebis est placée sur une table inclinable ; elle est immobilisée en décubitus dorsal et l'arrière train est soulevé un peu plus que la tête de façon à faciliter l'observation des ovaires grâce au tassement des viscères contre le diaphragme. La paroi abdominale est rasée et désinfectée. Deux anesthésies locales, avec chacune 1 ml de xylocaïne 2%, sont pratiquées aux endroits prévus pour la pose de l'endoscope et du palpeur, c'est-à-dire à 10 cm de part et d'autre de la ligne médiane et à une quinzaine de cm de la naissance du pis, en évitant soigneusement la veine mammaire. Les instruments introduits, après perforation au trocart, sont un endoscope Wolf muni d'une fibre de verre souple qui le relie à une source lumineuse de 150 Watts et une pince atraumatique. De l'air sec stérile est insufflé afin de soulever la paroi abdominale du péritoine.

Le tractus génital est ainsi livré à l'œil de l'observateur. Une observation rapide permet de repérer les ovaires qui sont saisis au niveau du ligament par la pince atraumatique et observés sur toutes les faces afin de dénombrer les corps jaunes et observer les follicules.

A la fin de l'observation des ovaires, la brebis reçoit une injection intramusculaire de pénicilline longue action (20mg/kg). Les incisions sont refermées avec des agrafes et recouvertes avec de l'Aluminium Spray (celui-ci constitue une couche protectrice contre les insectes et les souillures). Les instruments sont désinfectés dans un bain d'Hibitane 5%.

3.Prélèvements de tissus adipeux

Les prélèvements de tissus adipeux se pratiquent au niveau de l'attache de queue de la brebis, là où la graisse se dépose le plus vite. Cette zone est d'abord tondue, aseptisée (Hibitane 5%), puis subit une anesthésie locale (xylocaïne 2% appliquée en 'ring block' c'est-à-dire de façon à encercler la zone concernée sur un diamètre de 10 cm). Une fois la brebis devenue insensible à cet endroit, une incision d'environ 1,5 cm y est pratiquée en utilisant un bistouri stérile. La graisse est alors prélevée en écartant le tissu conjonctif à l'aide d'une pince stérile. La portion de tissu adipeux prélevée est immédiatement plongée dans l'azote liquide, et ensuite, placée dans des cryotubes stériles pour le stockage dans une cruche d'azote.

4.Extraction de l'ARN

4.1.Principe

Cette technique requiert quelques mesures de sécurité telles que porter un tablier propre et des gants, utiliser du matériel stérilisé, travailler sous une hotte aspirante et éviter le contact direct ou l'inhalation des produits toxiques utilisés.

Les solutions utilisées pour les différentes techniques sont présentées en annexes. Les solutions auto-clavées sont indiquées en annexe 1, les solutions non auto-clavées en annexe 2 et la préparation des réactifs et mélanges congelés en annexe 3.

L'extraction se fait à l'aide de Tri-pur (Boehringer-Roche), méthode phénol-chloroforme améliorée. Le Tri-pur est une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate. Ce réactif maintient l'intégrité de l'ARN lors de la destruction et de la dissolution des composants cellulaires. L'addition de chloroforme, suivie d'une centrifugation, sépare la solution en une phase aqueuse et une phase organique contenant l'ARN. Après élimination de la phase aqueuse, l'ARN est récupéré par précipitation avec de l'alcool isopropylique.

L'extraction a permis de constituer un pool d'ARN pour chaque échantillon. Les réactions de RT-PCR semi-quantitative et compétitive ont été effectuées à partir de ces mêmes pools pour chaque échantillon.

4.2.Matériel

- Microcentrifugeuse (Beckman Coulter Microfuge®18 Centrifuge (Analisis))
- Tige ultraturax (1 cm de diamètre) nettoyée avec solution de lavage (NaOH 1 M, SDS 1%, chauffer à 65°), rincée à l'eau DEPC et séchée dans un emballage en aluminium à 180°C pendant 36 heures.
- Tips , tubes à fond rond de 13 cm
- glace pilée
- récipients en verre ou polypropylène auto-clavés
- tubes de type falcon (considérés stériles)

4.3.Réactifs et solutions

- Tri-pur (réf. 1 667 157, 50 ml, Roche)
- Chloroforme 99+% (réf. C-2432, 25 ml, Sigma)
- alcool isopropylique (isopropanol 99+%) (réf. I-9516, 25 ml, Sigma)
- éthanol 75% (voir préparation en annexe 2)
- eau DEPC (voir préparation en annexe 1)
- T10E1 (voir préparation en annexe 1)
- eau distillée auto-clavée

4.4. Protocole

- mettre 1 ml de Tri-pur dans un tube à fond rond de 15ml
- ajouter 200 mg de tissu adipeux
conserver les tubes dans la glace pilée entre les étapes.
- homogénéiser à l'Ultraturax (environ 3 minutes avec des mouvements de rotation et verticaux)
- placer dans un tube Eppendorf de 1.5 ml
- laisser reposer à t° ambiante pendant 5 minutes.
- centrifuger avec une microcentrifugeuse à 4°C à 12 000 rpm pendant 15 min
- les échantillons contenant beaucoup de graisse présentent souvent un excès collecté à la surface qui doit être enlevé (à l'aide d'un tip de 1 ml)
- reprendre le surnageant en versant le liquide, éventuellement en s'aidant d'un tip, dans un autre tube et laisser reposer pendant 5 min à t° ambiante
- ajouter 200µl de chloroforme
- mélanger par inversion pendant 15 sec et laisser reposer pendant 5 minutes à t° ambiante
- centrifuger à 12 000 rpm pendant 15 min à 4°C
- prélever la phase supérieure transparente contenant l'ARN à l'aide d'une pipette 100 µl (l'ADN et les protéines étant dans la phase blanche, le fraction organique dans la phase rouge)
- ajouter 500µl d'alcool isopropylique (isopropanol) par ml de Tri-pur
- mélanger par inversion pendant 15 sec et laisser reposer pendant 10 minutes à t° ambiante
- centrifuger à 12 000 rpm pendant 10 min à 4°C
- on obtient un micro-culot d'ARN
- éliminer le surnageant en versant le liquide dans un Eppendorf en s'aidant d'un tip
- laver l'ARN avec 1 ml d'éthanol 75 % en vortexant
- centrifuger à 7500 rpm pendant 5 min à 4°C
- enlever le surnageant en versant le liquide avec un tip et sécher le culot à l'air libre, attention ne pas sécher complètement si on veut le dissoudre facilement
- resuspendre le culot dans du T10E1 (20 µl) en passant plusieurs fois la solution dans le tip de la pipette
- incubé les ARN à 55°C pendant 10 min
- mesurer la quantité et la pureté de l'ARN en solution au spectrophotomètre
- conserver dans la glace pilée avant la manip suivante, conserver le surplus à - 20°C (-80°C en théorie).

5. Dosage des acides nucléiques

5.1. Principe

Les acides nucléiques absorbent la lumière UV à une longueur d'ondes de 260 nm. Une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration connue en ADN double brin, ARN, ADN simple brin.

1 DO = 50 µg/µl d'ADN double brin

40 µg/µl d'ARN

33 µg/µl d'ADN simple brin

5.2. Matériel

- Spectrophotomètre (Biotech Photometer, UV 1101 de chez Labo-Modern)
- Cuvette en quartz

5.3. Réactifs et solutions

- T10E1 (voir préparation en annexe 1)
- eau distillée pour rincer les cuvettes

5.4. Protocole

- mettre 1 ml de T10E1 dans une cuvette en quartz et l'insérer dans le spectrophotomètre, bien fermer le couvercle
- effectuer la mise à zéro :
- placer le spectro en mode ARN ss pour de l'ARN ou en mode ADN ds pour de l'ADN
- ajouter 1 µl de la solution d'acide nucléique dans la cuvette, mélanger
- placer dans le spectro

On obtient la concentration en ARN ou ADN dans l'unité choisie en tenant compte de la dilution.

On peut obtenir aussi la DO à 260 nm (multiplier par la concentration/DO donnée de cet acide nucléique, tenir compte de la dilution).

La pureté de l'ARN ou de l'ADN peut être estimée en calculant le rapport de l'absorbance à 260 nm et de l'absorbance à 280 nm. Théoriquement, dans l'eau, l'ARN pur a un rapport de 2 (attention si la dissolution de l'ARN est partielle, le rapport est inférieur à 1.6) et l'ADN, un rapport de 1,8.

6.RT-PCR

6.1.Principe

Le principe de la RT-PCR a été décrit au chapitre III.

6.2.Matériel

- Thermocycler avec bonnet chauffant (PTC-0150 MiniCycler Version 4.0 de chez BIOzym)
- Mini centrifugeuse pour microtubes (Micro Centrifuge Fisherbrand, Model 220 VAC, vit. = 6.000RPM)
- Tubes PCR stériles à couvercles bombés
- Tips stériles avec filtres

6.3.Réactifs et solutions

A.Pour la reverse transcription :

- mélanges RT1 et RT2 préparés à l'avance et congelés (voir préparation en annexe 3)
Ces mélanges contiennent les dNTP et les random primers nécessaires pour former de l'ADNc à partir d'ARN, ainsi que les tampons de reverse transcription et le DTT.
- kit *Super-Script RnaseH-* (de Invitrogen life technologies cat 18003-017) selon le protocole du fabricant (10000 U, 200 U/μl)

B.Pour la PCR :

- mélanges PCR leptine 2 pour les réactions de PCR semi-quantitative et de PCR compétitive (voir préparation en annexe 3)
- mélanges PCR leptine 1 pour la réaction de PCR servant à la synthèse du compétiteur (voir préparation en annexe 3)
- mélanges PCR β-actine pour la réaction de PCR semi-quantitative (voir préparation en annexe 3)
- Taq DNA polymérase (5 U/μl) (réf. T0303z de amersham pharmacia biotech)

6.4. Protocole

A. Réaction de reverse transcription :

Au préalable, centrifuger pendant quelques secondes les microtubes contenant les solutions et l'ARN afin de collecter tout le liquide au fond du tube.

- ajouter les composants suivants dans un microtube à centrifuger
 - 12 μ l mélange RT1
 - 2 μ g RNAtot
- chauffer le mélange à 65°C pendant 5 minutes et refroidir rapidement sur de la glace
- ajouter 6 μ l de mélange RT2, mélanger doucement
- incuber 10 min à 25°C puis 2 min à 37°C
- ajouter 1 μ l (200 U) de Superscript RT, mélanger en pipettant doucement.
- incuber 50 min à 37°C
- inactiver la réaction en chauffant 15 min à 70°C

Placer dans la glace pour le PCR ou conditionner pour la congélation.

B. Réaction de PCR :

a) conditionnement des mélanges PCR

Chauffer les mélanges PCR pendant 10 min. à 85°C.

b) préparation des tubes

Mettre tout ce qui n'est pas échantillon pour commencer afin de ne pas contaminer les tubes entre eux !

- ajouter la taq polymérase aux mélanges PCR préchauffés
(2 U à ajouter à 150 μ l de chaque mélange PCR)
- numéroter les tubes
- mettre 15 μ l de chaque mélange PCR dans chaque tube respectif.
- mettre 5 μ l de produit de RT / tube, mélanger avec la pipette
- fermer le couvercle.
- placer les tubes dans le thermocycler
- effectuer les cycles PCR selon le type d'ADNc à amplifier.

7.RT-PCR semi-quantitative

7.1.Principe

Le principe de la RT-PCR semi-quantitative a été décrit au chapitre III. Les analyses réalisées par cette méthode ont été effectuées avec le restant d'ARN provenant du même pool d'extraction et ont servi uniquement à valider la méthode de RT-PCR compétitive. C'est pourquoi elles n'ont été réalisées que sur un petit nombre d'échantillons.

A.Recherche des amorces pour la séquence de leptine ovine

Les primers utilisés pour l'amplification de la leptine dans les réactions de RT-PCR semi-quantitative et compétitive sont ceux utilisés par Yuen et al. (1999).

Primer 1 :

5'-GACATCTCACACACGCAG-3'

Température de melting = 56°C

Primer 2 :

5'-GAGGTTCTCCAGGTCATT-3'

Température de melting = 54°C

La séquence de leptine ovine a pu être obtenue par la banque de données BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Après amplification avec ces primers, la séquence résultante est de 183 pb (séquence 43-225 de la séquence de 350 nucléotides de la leptine ovine (U62123 dans BLAST)).

Séquence de leptine ovine (U62123) :

```
1  GACACCAAAA CCCTCATCAA GACGATTGTC ACCAGGATCA ATGACATCTC ACACACGCAG
61  TCCGTCTCCT CCAAACAGAG GGTCAGTGGC TTGGACTTCA TCCCTGGGCT CCACCCTCTC
121 CTGAGTTTGT CCAAGATGGA CCAGACATTG GCAATCTACC AACAGATCCA CGCCAGTCTG
181 CCTTCCAGAA ATGTGATCCA AATATCTAAT GACCTGGAGA ACCTCCGGGA CCTTCTCCAC
241 CTGCTGGCGG GCTCCAAGAG CTGCCCCTTG CCGCAGGTCA GGGCCCTGGA GAGCTTGGAG
301 AGCCTGGGCG TCGTCCTGGA AGCCTCCCTC TACTCCACAG AGGTTTTAGC
```


B. Recherche des amorces pour la séquence de la β -actine :

Les primers utilisés pour l'amplification de la β -actine dans la réaction de RT-PCR semi-quantitative sont ceux utilisés par Tai et al. (1998).

Primer 1 :

5'-AGACCTTCAACACCCCTGCC-3'

Température de melting = 57°C

Primer 2 :

5'-TGCTGGAAGGTGGACAGTGA-3'

Température de melting = 57°C

La séquence de la β -actine a pu être obtenue par la banque de données BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Après amplification avec ces primers, la séquence résultante est de 688 pb (séquence 32-719 de la séquence de 741 nucléotides de la β -actine ovine (AF035422 dans BLAST)).

Séquence de la β -actine (AF035422) :

```
1  AACCGTGAAA AGATGACCCA GATCATGTTT GAGACCTTCA ACACCCCTGC CATGTACGTG
61  GCCATCCAGG CTGTGCTGTC CCTGTACGCC TCTGGCCGCA CCACTGGCAT CGTGATGGAC
121 TCCGGTGACG GGGTCACCCA CACGGTGCCC ATCTACGAAG GGTACGCCCT CCCCCACGCC
181 ATCCTGCGTC TGGACCTGGC TGGCCGGGAC CTGACGGACT ACCTCATGAA GATCCTCACG
241 GAGCGTGGCT ACAGCTTCAC CACCACGGCC GAGCGGGAAA TCGTCCGTGA CATCAAGGAG
301 AAGCTCTGCT ACGTGGCCCT GGACTTCGAG CAGGAGATGG CCACCGCGGC CTCCAGCTCC
361 TCCCTGGAGA AGAGCTACGA ACTGCCGGAC GGGCAGGTCA TCACCATCGG CAATGAACGG
421 TTCCGCTGCC CTGAAGCTCT CTTCCAGCCT TCCTTCCTGG GCATGGAATC CTGCGGCATT
481 CACGAAACTA CCTTCAATTC CATCATGAAG TGTGACGTCG ACATCCGCAA GGACCTCTAT
541 CCAACACGG TGCTGTTCGG GGGGACCACC ATGTACCCTG GCATCGCAGA CAGGATGCAG
601 AAAGAAATCA CTGCCCTGGC ACCTAGCACA ATGAAAATCA AGATCATCGC GCCTCCTGAG
661 CGCCAATTCT CCCTGTGGAT TGGTGGGTCC ATCTGGCTCG CACTGTTTAC CTTCCAGCAG
721 ATGTGGTACA GCAAGCAGGA G
```

7.2.RT-PCR

A.Réaction de reverse transcription :

La réaction de reverse transcription est réalisée selon la même méthode que celle décrite au point 6.

B.Réaction de PCR :

La réaction de PCR est réalisée avec les mélanges PCR leptine 2 et β -actine selon la même méthode que celle décrite au point 6.

L'amplification des ADNc de leptine et β -actine s'effectue dans des tubes différents, selon la programmation des cycles suivants :

- 27 cycles PCR : • 60 sec à 94°C
- 15 sec à 53°C
- 60 sec à 72°C

7.3.Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est réalisée selon la méthode décrite au point 9.

On obtient des fragments de 183 pb pour la leptine ovine et 688 pb pour la β -actine (figure 19).

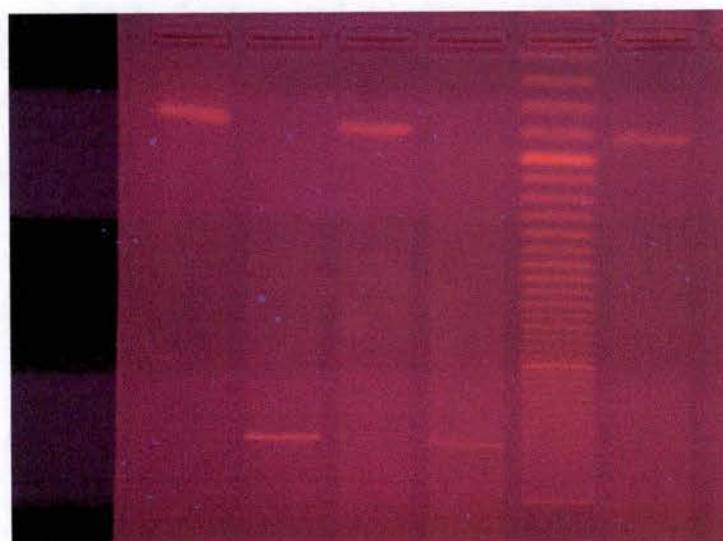


Figure 19 : Image obtenue après enregistrement numérique.

8.RT-PCR quantitative compétitive

8.1.Synthèse de l'ARN compétiteur

8.1.1.Principe

Le principe de la synthèse du compétiteur a été décrit au chapitre III.

8.1.2.RT-PCR

A.Réaction de reverse transcription :

La réaction de reverse transcription est réalisée selon la même méthode que celle décrite au point 6.

B.Réaction de PCR :

La réaction de PCR est réalisée avec les mélanges PCR leptine 1 selon la même méthode que celle décrite au point 6.

L'amplification de l'ADNc de la leptine s'effectue selon la programmation suivante :

- préincuber 5 min. à 95°C
- réaliser 35 cycles PCR :
 - 30 sec à 95°C
 - 30 sec à 60°C
 - 30 sec à 72°C
- permettre l'élongation totale des brins d'ADN amplifiés en prolongeant le dernier cycle de 5 min. à 72°C.

8.1.3.Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est réalisée selon la même méthode que celle décrite au point 9.

On obtient des fragments de leptine ovine de 245 bp.

8.1.4. Purification de l'ADN à partir du gel d'agarose

La purification de l'ADN à partir du gel d'agarose s'effectue à l'aide du kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (réf. 27-9602-01 de Amersham).

Matériel :

- Microcentrifugeuse (Beckman Coulter Microfuge®18 Centrifuge, Analis)
- Balance (Sartorius GMBH Göttingen, type R300S, 220 V~50/60 Hz)
- Transilluminateur (UV Transilluminator, Model M-15, 230 V~50 Hz ; 0.75 Amps ; Upland, CA 91786 USA)
- Visière de protection anti-UV

Réactifs et solutions :

- Capture Buffer
- GFX colonnes
- tubes collecteurs
- Wash Buffer : Tris-EDTA buffer : ajouter 48 ml d'éthanol absolu pour obtenir une concentration finale de 80%.
- TE Buffer : 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA (= T10E1)
ou eau distillée autoclavée

Protocole :

Une colonne ne peut contenir qu'un volume max de 600µl, c-à-d 300 mg de gel et 300µl de Capture Buffer.

- peser un tube microcentrifuge de 1,5 ml vide
- utiliser une lame de rasoir propre pour exciser le morceau d'agarose contenant l'ADN à purifier. Couper aussi près que possible de l'ADN. On travaille sur le gel soumis aux rayons UV du transilluminateur c'est pourquoi il est indiqué de porter une visière de protection anti-UV
- couper le morceau en plus petites pièces et transférer celles-ci dans le tube microcentrifuge pré-pesé
- peser le tube contenant les morceaux de gel et déduire le poids du tube vide, afin de déterminer le poids du morceau de gel contenant l'ADN
- ajouter 10µl de Capture Buffer pour 10 mg de gel (pas plus de 300µl au total) fermer le tube et vortexer
- incuber dans une étuve à 60°C jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous (5 à 15 min)
- durant l'incubation, placer une colonne GFX dans un tube collecteur
- une fois l'agarose dissous, centrifuger brièvement pour collecter l'échantillon au fond du tube
- transférer l'échantillon sur la colonne GFX. Incuber à t° ambiante pendant 1 min.
- centrifuger dans un microcentrifuge à 10.000 rpm pendant 30 sec.

- éliminer le liquide en vidant le tube collecteur. Replacer ensuite la colonne à l'intérieur du tube collecteur
- ajouter 500µl de Wash Buffer à la colonne. Centrifuger à 10.000 rpm pendant 30 sec.
- enlever le tube collecteur et transférer la colonne GFX sur un nouveau tube microcentrifuge de 1,5 ml (pas un tube collecteur)
- appliquer 50µl de TE Buffer directement sur la matrice fibreuse de la colonne GFX. Rq : pour éluer l'ADN sous une forme plus concentrée, ajouter 10µl de TE Buffer
- incuber l'échantillon à t° ambiante pendant 1 min.
- centrifuger à 10.000 rpm pendant 1 min pour obtenir l'ADN purifié.

8.1.5. Dosage de l'ADNc

La dosage de l'ADNc purifié s'effectue au spectrophotomètre selon la méthode décrite au point 5.

8.1.6. Transcription in vitro

Principe :

Après la récupération et la purification de l'ADNc du compétiteur, celui-ci doit être transcrit afin de constituer un pool d'ARNm qui sera utilisé pour la RT-PCR compétitive.

Matériel :

- Thermocycler (PTC-0150 MiniCycler, Version 4.0 de chez BIOzym)
- Mini centrifugeuse pour microtubes (Micro Centrifuge Fisherbrand, Model 220 VAC, vit. = 6.000RPM)

Réactifs et solutions :

- mélange de transcription préparé à l'avance et congelé (voir préparation en annexe 3)
- T7 RNA polymérase (20 U/µl, réf. R0884 Sigma)
- DNase I Rnase-free (10 U/µl, réf. 27-0514 Amersham)
- EDTA 0.2M (voir préparation en annexe 2)

Protocole :

- décongeler 20 µl de mélange de transcription de sorte qu'il soit à t° ambiante avant d'y ajouter le template. (En effet, à froid, le complexe ADN-spermidine précipite)
- à ce mélange, ajouter : - 2 µg de template d'ADNc purifié
- 1 µl de T7 RNA polymérase (20 U/µl)
- incuber à 37°C pendant 1 h.
- éliminer le template de cDNA avec 20 U de DNase I Rnase-free (10U/µl): incuber à 37°C pendant 15 min.
- stopper la réaction avec 2 µl de 0,2 M EDTA: l'EDTA chélate les cations bivalents libres tels que le Mg²⁺ et stoppe ainsi la réaction.

8.1.7. Purification et précipitation de l'ARN

La récupération du produit de transcription purifié s'effectue à l'aide du kit *MEGAclear Purification Kit* (réf. 1908 de Ambion).

Matériel :

- Microcentrifugeuse (Beckman Coulter Microfuge®18 Centrifuge, Analys)
- Filtres et tubes collecteurs (fournis avec le kit)

Réactifs et solutions :

- Binding Solution Concentrate
- Wash Solution Concentrate à laquelle on ajoute de l'éthanol 100%
- Elution Solution
- 5 M Ammonium Acétate
- éthanol 100%
- éthanol 70%
- eau DEPC (voir préparation en annexe 1)

Protocole

- porter l'ARN à un volume de 100 µl avec la Elution Solution, mélanger
- ajouter 350 µl de Binding Solution Concentrate à l'échantillon. Mélanger doucement avec la pipette
- ajouter 250 µl d'éthanol 100%. Mélanger en pipettant
- insérer un filtre dans un tube collecteur
- pipetter la mixture d'ARN sur le filtre
- centrifuger pendant 15 sec à 1 min à 12000 rpm, pour éluer le mélange, l'ARN restant fixé à la matrice de la colonne
- éliminer le liquide et réutiliser le tube collecteur pour les étapes de lavage
- ajouter 500 µl de Wash Solution à la colonne. Eluer en centrifugeant comme dans l'étape précédente. Eliminer le liquide
- répéter avec une seconde aliquote de 500 µl de Wash Solution
- après avoir écarté la solution de lavage, re-centrifuger pendant 10 à 30 sec pour enlever les dernières traces de solution de lavage
- placer le filtre dans un nouveau tube collecteur
- appliquer 50 µl de solution d'élution au centre du filtre. Fermer le capuchon du tube et incuber dans une étuve à 65-70°C pendant 5 à 10 min.
- récupérer l'ARN élué en centrifugeant pendant 1 min à 12000 rpm.
- pour maximiser la récupération d'ARN, répéter cette procédure d'élution avec un second aliquot de solution d'élution. Collecter l'éluat dans le même tube
- pour concentrer l'ARN, précipiter comme suit :
 - ajouter 10 µl d'acétate d'ammonium 5 M à l'ARN purifié
 - ajouter 275 µl d'éthanol 100%. Bien mélanger et incuber à -20°C pendant 30 min
 - microcentrifuger à vitesse maximale pendant 15 min
 - enlever prudemment le surnageant
 - laver le culot avec 500 µl d'éthanol 70% froid, centrifuger à nouveau et enlever l'éthanol

- pour enlever les dernières traces d'éthanol, re-centrifuger rapidement le tube et aspirer tout fluide résiduel avec un fin tip
- laisser sécher le culot à l'air
- resuspendre le culot dans 10 µl d'eau DEPC.
- traiter à nouveau l'échantillon d'ARN à la Dnase afin d'éliminer les dernières traces de template : ajouter 1U par µl d'échantillon de Dnase Rnase-free (10U/µl) et incubé à 37°C pendant 15 min.

8.1.8.Quantification et conditionnement de l'ARN compétiteur

La quantification s'effectue au spectrophotomètre selon la méthode décrite au point 5.

Ajouter 1 µl de RNase inhibitor (20U/µl, Amersham pharmacia biotech) pour éviter la dégradation pendant le stockage et les manipulations.

Aliquoter par 2 µg et stocker à -80°C.

8.1.9.Electrophorèse en gel d'agarose-formaldéhyde

Matériels :

- cuve à électrophorèse (BIOplastics BV)
- source (Consort E143)

Réactifs et solutions :

- étalon d'ARN : RNA marker 0.1-1 Kb (50 µg) (réf. R-6895 de Sigma, 10 bandes)
- formaldéhyde 37% (1 litre) (réf. 6545.1000 de MERCK)
- formamide désionisé (1 litre) (réf. 6557.1000 de MERCK)
- tampon de chargement pour ARN (voir en annexe 2)
- tampon MOPS 10x (voir préparation en annexe 2)
- eau DEPC
- agarose

La manipulation du formaldéhyde et formamide doit se faire sous hôte.

Protocole :

a) préparation du gel :

Les ARN sont séparés en gel d'agarose-formaldéhyde 1,4% réalisé dans un tampon MOPS 1X contenant 2,2M de formaldéhyde.

Pour un gel à 1,4% :

- préparer 1 litre de tampon MOPS 1X en diluant 100 ml de MOPS 10X dans 800 ml d'eau DEPC. Ajuster à pH 7.0 avec du NaOH. Porter à 1 litre avec de l'eau DEPC.
- peser 1,4 g d'agarose et les dissoudre dans 94 ml de MOPS 1X, le porter à ébullition au micro-onde, mélanger et garder sous agitation
- refroidir la solution jusqu'à 60°C
- ajouter 6 ml de formaldéhyde 37% (2,2M au final)
- couler le gel dans l'appareil à électrophorèse

Le gel doit être coulé 2h. avant son utilisation ; la présence du formaldéhyde ralentissant la gélification de l'agarose.

b) préparation des échantillons :

- porter l'ARN (2 µg) à un volume de 6 µl avec de l'eau Rnase-free
- ajouter à chaque échantillon d'ARN et à 2 µl d'étalon :
 - 2 µl de MOPS 10X
 - 2 µl de formaldéhyde 37%
 - 9 µl de formamide désionisé
 - 4 µl d'éthidium bromide (à partir

d'une solution de bromure d'éthidium 1% diluée 20X)

- mélanger et chauffer les échantillons pendant 10 min à 70°C, puis les mettre sur la glace pendant au moins 1 min.

c) électrophorèse :

- verser le reste du tampon MOPS 1X sur le gel jusqu'à le recouvrir
- ajouter 1 µl de solution de chargement (annexe 2) à chaque échantillon
- charger le gel avec les échantillons et l'étalon d'ARN
- laisser migrer pendant 2 h. à 3,5 Volt/cm (= 73,5V pour 21cm)
- visualiser sous UV.

8.2.RT-PCR compétitive

8.2.1.Principe

Le principe de la RT-PCR compétitive a été décrit au chapitre III.

8.2.2.RT-PCR

A.Réaction de reverse transcription :

Au préalable, l'ARN compétiteur est dilué dans de l'eau DEPC afin d'obtenir les concentrations suivantes : 62 pg, 31pg, 15.15 pg, 7.75 pg, 3.375 pg.

Cependant, certains échantillons nécessitent une gamme de dilutions plus ou moins concentrée selon leur taux d'expression.

L'ARN cible, 2 µg, est alors ajouté à chacun des tubes contenant l'ARN compétiteur. Le blanc contient 31pg d'ARN compétiteur et 2 µg d'ARN cible.

La réaction de rétro-transcription se déroule selon la même méthode que celle décrite au point 6.

B.Réaction de PCR compétitive :

La réaction de PCR est réalisée avec les mélanges PCR leptine 2 selon la même méthode que celle décrite au point 6 et selon la même programmation de cycles PCR que celle utilisée pour la PCR semi-quantitative (point 7).

8.2.3.Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est réalisée selon la méthode décrite au point 9.

L'ADN compétiteur est attendu à 165 pb, tandis que l'ADN cible est attendu à 183 pb.

8.2.4.Analyse des résultats de la PCR compétitive

Le gel obtenu est analysé selon la méthode décrite au chapitre III.

9. Electrophorèse sur gel d'agarose

9.1. Principe

L'ADNc obtenu est mis à migrer sur un gel d'agarose 3 % afin d'en vérifier la taille et d'étudier l'expression de la leptine.

Un étalon de fragments d'ADN de taille connue est mis à co-migrer afin d'estimer la taille des brins d'ADN.

L'ADN est détecté dans le gel en présence de bromure d'éthidium. Ce dernier s'intercale entre les 2 brins de l'ADN et peut être visualisé en utilisant un transilluminateur UV réglé sur 302 nm.

9.2. Matériel

- Transilluminateur (UV transilluminator (UVP), Model M-15, 230 V~ 50 Hz ; 0.75 Amps ; Upland, CA 91786 USA)
- une cuve à électrophorèse (BIOplastics BV)
- une source (Consort E 143)
- une balance pour peser l'agarose (Sartorius GMBH Göttingen, type R300S, 220 V~50/60 Hz)
- appareil photos numérique avec zoom (NIKON Coolpix 990 ; 3,34 Mega Pixels ; programmé en qualité FINE)

9.3. Réactifs et solutions

- Tampon TAE 1 x (Tris-acétate 40mM, EDTA 1 mM pH 8.0) (voir préparation en annexe 2)
- Agarose 3 % (en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer)
- Bromure d'éthidium (solution stock à 10 mg/ml)
- Etalon (Superladder-low 20bp Ladder, cat. MW-0302-04 Eurogentec) 2µl + T10E1 13 µl, contenant les standards de masse moléculaire (50 bandes espacées de 20 pb)
- Tampon de chargement pour ADN 10x concentré (voir préparation en annexe 2)

9.4. Protocole

A. Préparation du gel d' agarose :

- mélanger 3 g d'agarose dans 1 ml de TAE 1x
- chauffer au micro-onde pour dissoudre l'agarose
- laisser refroidir sous agitation lente afin d'éviter de faire des bulles
- quand la température est < à 45°C, ajouter 10 µl de bromure d'éthidium (solution mère à 10 mg/ml) (soit une concentration finale de 0.1 mg de bromure d'éthidium par ml de gel)
- couler le gel. Laisser solidifier

- remplir la cuve avec 900 ml de tampon de façon à recouvrir la surface du gel

B.Traitement et chargement des échantillons :

Les colorants sont ajoutés aux échantillons et non au gel.

- ajouter 2 μ l de tampon de chargement colorant pour 20 μ l de solution PCR (échantillons et étalon de masse moléculaire)
- déposer 16 μ l des différents échantillons dans les puits du gel d'agarose
- ajouter dans un autre puits l'étalon de masse moléculaire
- laisser migrer les échantillons dans le tampon d'électrophorèse TAE 1x durant 1 heure sous une différence de potentiel de 125 mA .

C.Analyse de l'intensité des bandes :

- visualiser les bandes au transilluminateur UV (réglé à 302 nm)
- effectuer un enregistrement numérique de l'image
- l'analyse des bandes est réalisée avec le logiciel 'NIH Image 1.62' (téléchargé du net à l'adresse '<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/manual/faq.html#mem>') après que l'image en couleurs ait été transformée en mode 'niveau de gris' grâce au logiciel 'Adobe Photoshop 5.5' et enregistrée en format TIFF.

10.Séquençage de l'ADN

L'ADN compétiteur a été séquencé afin de vérifier le bon résultat de sa synthèse. Le séquençage a été réalisé par madame De Snoeck du département de neurobiologie, à l'aide de l'appareil de séquençage automatique ABI PRISM 377 DNA sequencer.

La méthode employée est le séquençage aux didéoxynucléotides développée par Sanger (figure 21). Cette méthode est basée sur l'ADN à simple brin et la synthèse d'ADN en présence de didéoxynucléotides dépourvus de groupement 3'hydroxyle (figure 20). Les triphosphates correspondants peuvent être incorporés dans une chaîne en cours d'élongation mais ils bloquent la synthèse parce qu'ils empêchent la liaison du nucléoside triphosphate suivant. Au départ, quatre tubes contenant de l'ADN simple brin correspondant à la séquence recherchée, de l'ADN polymérase et un court segment d'ADN marqué servant d'amorce sont préparés. Chaque tube reçoit ensuite une petite quantité d'un ddNTP différent (ddATP, ddTTP, ddCTP ou ddGTP) en même temps que les quatre déoxyribonucléotides normaux (dNTP). Dans chaque tube, un mélange de chaînes de longueurs différentes est produit, chacune correspondant au point où le ddNTP présent dans ce tube est incorporé et provoque l'arrêt de la croissance de la chaîne. Ces longueurs sont à leur tour une indication précise de l'endroit où les bases complémentaires des ddNTP sont présentes dans le brin matrice. La détection est possible grâce à des colorants fluorescents fixés aux amorces nucléotidiques. Dans ce cas, un fluorophore différent émettant à une longueur d'onde différente est utilisé pour chacune des quatre réactions, ce qui permet de distinguer les quatre mélanges et de les soumettre ensemble à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Griffiths *et al.*, 1997).

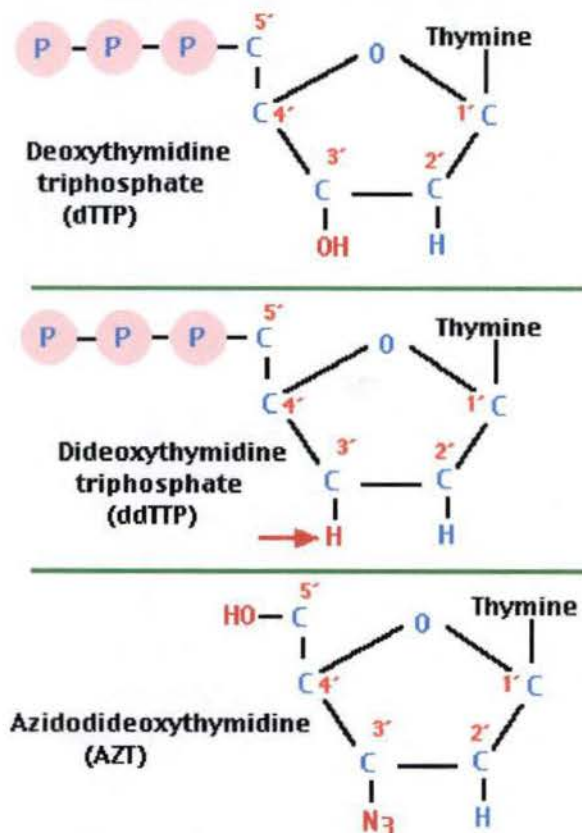


Figure 20: Schéma représentant la différence entre un déoxynucléotide et un didéoxynucléotide.

(<http://www.ultranet.com/~jkimball/BiologyPages/D/DNAsequencing.html>)

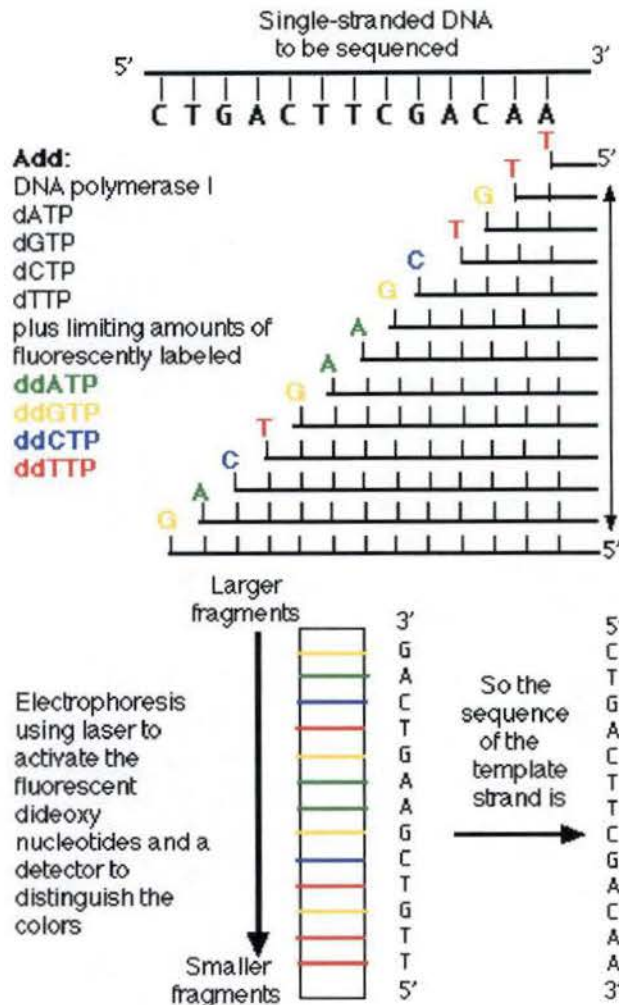


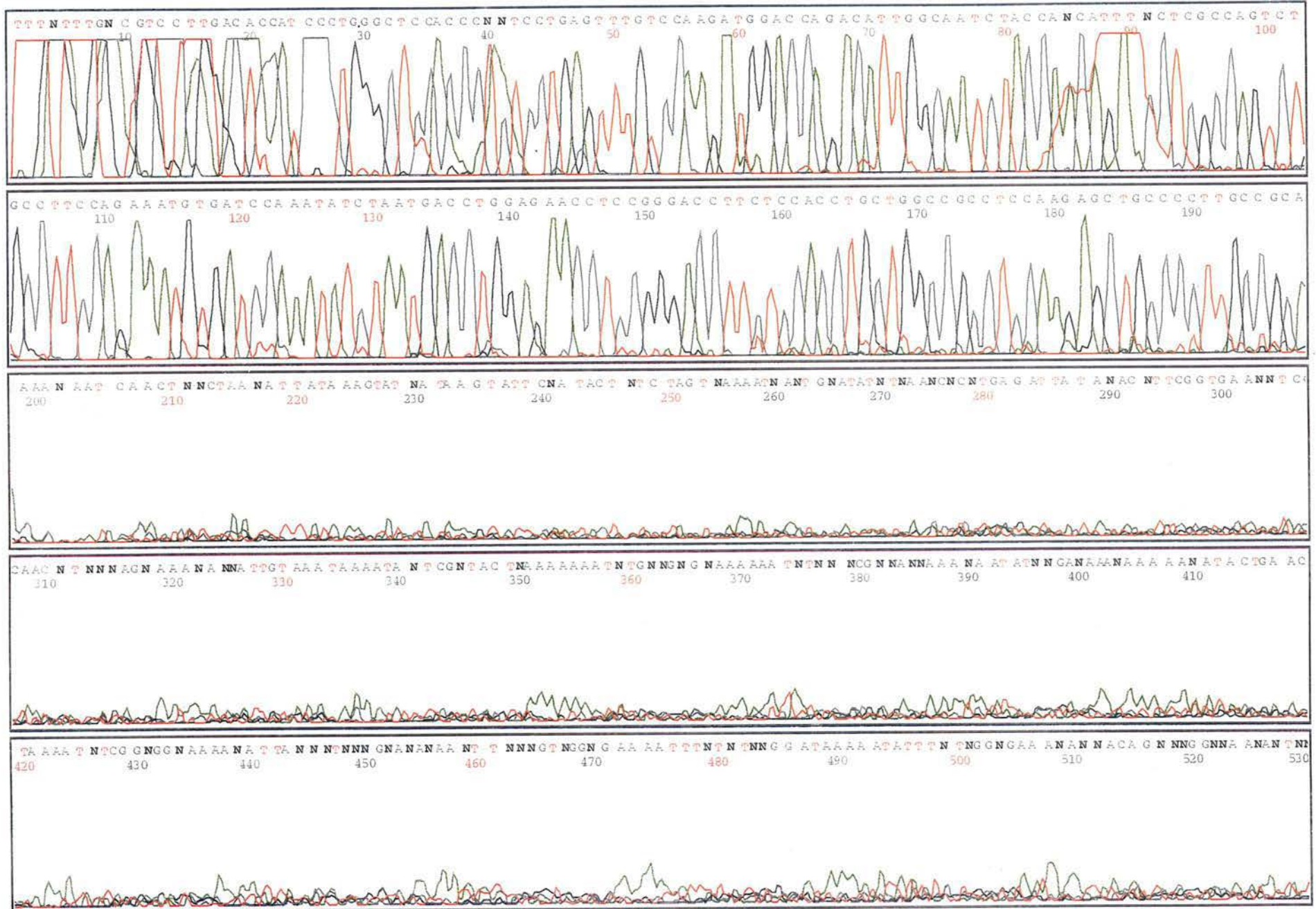
Figure 21 : Schéma représentant la méthode de séquençage utilisée.
(<http://www.ultranet.com/~jkimball/BiologyPages/D/DNAsequencing.html>)

La figure 22 montre la succession des pics colorés obtenus à partir de l'ADN compétiteur, où N représente une base qui n'a pu être identifiée. Celle-ci permet la lecture directe de la séquence nucléotidique :

```
TTTNTTTGNCGTCCTTGACACCATCCCTGGGCTCCACCCNNTCCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGC
AATCTACCANCATTTNCTCGCCAGTCTGCCTTCCAGAAATGTGATCCAAATATCTAATGACCTGGAGAACCTCCG
GGACCTTCTCCACCTGCTGGCCGCCTCCAAGAGCTGCCCTTGCCGCAAAA
```

Les séquences homologues sont recherchées parmi les séquences connues à l'aide de la base de données de séquences d'acides nucléiques BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Parmi les séquences les plus proches figure la séquence d'ARNm de la leptine ovine (avec 96% d'identité), confirmant ainsi que notre séquence est bien celle de la leptine ovine.

Figure 22 : Graphe obtenu après séquençage.

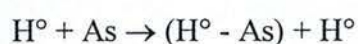


11. Dosages hormonaux

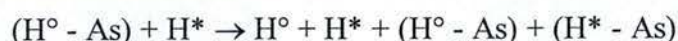
11.1. Principe du dosage R.I.A.

Le dosage radio-immunologique est basé sur la compétition entre une quantité déterminée d'hormone marquée par la fixation d'un ou plusieurs atomes radioactifs (tels que I^{125} ou H^3) et une quantité variable et inconnue de la même hormone se trouvant dans l'échantillon à analyser, vis-à-vis d'un anti-sérum (As) qui leur est spécifique.

L'hormone 'froide' (H^0) peut se lier à l'anti-sérum spécifique et la réaction peut s'écrire de la manière suivante :



En ajoutant à ce système l'hormone marquée, on obtient une nouvelle équation :



La quantité d'hormone marquée (H^*) fixée aux anticorps est d'autant plus faible que celle de l'hormone 'froide' (H^0) contenue dans l'échantillon sera élevée, et inversement.

En séparant H^* liée à l'anti-sérum de H^* libre, on peut calculer, par analyse de la radioactivité de l'une de ces deux fractions, la quantité de H^0 . Une courbe standard effectuée dans les mêmes conditions avec des quantités connues et croissantes d' H^0 sert de référence.

11.2. Appareillage

La mesure de la radioactivité, fournie par l'émission de rayonnements β (H^3), est effectuée par un analyseur de scintillation à passeur d'échantillons Beckman LS6000SC. Le temps de comptage est fixé à 10 minutes/échantillon.

La mesure de la radioactivité γ (I^{125}) est réalisée sur le compteur GammaMaster LKB Wallac à passeur d'échantillons, avec un temps de comptage fixé à 60 secondes.

11.3.Calcul des résultats

La radioactivité de la fraction liée peut être déterminée selon le modèle mathématique couramment appliqué aux dosages R.I.A., et qui se traduit par l'équation suivante :

$$A = A_0 \frac{C_m}{C_m + C_f} + BG$$

- A : radioactivité de la fraction liée (en cpm) pour une certaine concentration en hormone froide
A₀ : radioactivité maximale de la fraction liée (en cpm), c'est-à-dire pour C_f=0
BG : radioactivité non spécifique (Background)
C_m : concentration en hormone marquée
C_f : concentration en hormone froide

Cette équation, ajustée aux données expérimentales de la courbe standard, permet de transformer en concentrations hormonales (ng/ml) les données obtenues en cpm.

La mesure des paramètres de cette formule (A₀, C_m et BG) est réalisée par un fitting de la courbe grâce au logiciel MATLAB.

11.4.Dosage de l'oestradiol (E₂)

Le dosage de l'E₂ nécessite une extraction préalable des stéroïdes.

Celle-ci est réalisée grâce à un mélange 50/50 d'acétate d'éthyl et de cyclohexane. A 200 µl de plasma sont ajoutés 2 ml du mélange d'extraction, le tout est vortexé pendant 2 minutes puis placé au congélateur. Une fois le plasma congelé, le milieu d'extraction surnageant est transvasé dans un nouveau tube en verre et placé dans une étuve sous vide (40°C) jusqu'à évaporation totale. L'extrait sec est dissous dans 200 µl de tampon phosphate 0.01M gélatiné à 1%.

Dans un nouveau tube en polystyrène, 100 µl de cette solution sont mis en présence de 50 µl d'antisérum et de 100 µl d'hormone tritiée (± 12.000 cpm). L'équilibre s'établit pendant 4 heures à 37°C.

La séparation entre la phase libre et la phase liée s'effectue par addition de 500 µl d'ARGG 1/20 en solution tampon contenant 6% de PEG 6000. La réaction se passe à 4°C pendant une nuit, après quoi les tubes sont centrifugés, le surnageant est éliminé à l'aide d'une trompe à vide et le culot (phase liée) suspendu dans 100 µl d'éthanol pour ensuite ajouter 2.5 ml de liquide scintillant.

Les tubes sont ensuite analysés dans un compteur de scintillation Beckman LS 6000 SC.

Cette technique est appliquée aux plasma ainsi qu'à une série de solutions d'E₂ de concentration connue afin d'établir une courbe de standardisation.

Les références de l'hormone et de l'anticorps sont E_{17B} tritiée (réf. TRK-322 de chez Amersham) et As E_{17B} (As lyophilisé de Marloie).

La sensibilité du dosage est de 0.56×10^{-3} ng/ml, ses coefficients de variation intra- et inter-essais respectivement de 8% et 11%.

11.5. Dosage de la FSH

Le dosage de la FSH est réalisé sans extraction et en présence de FSH purifiée marquée à l'I¹²⁵. Cette dernière est préparée au laboratoire par marquage de 4 µg de ₀FSH avec 1 ml d'I¹²⁵ par la technique d'oxydation à la chloramine T.

Les manipulations du RIA sont les suivantes.

Un échantillon de 50 µl de plasma est additionné de 50 µl d'anticorps spécifique (As FSH NIAMDD-₀FSH-I-1, AFP-C5288113). Après 2 à 4 heures d'incubation, 50 µl d'hormone marquée (20.000 cpm) y sont mélangés (au vortex) et l'équilibre s'établit durant une nuit.

Le second anticorps (ARGG) en solution tampon avec du PEG (6%) et de la cellulose (0.5%) est ajouté à raison de 250 µl. Après 2 à 4 heures, les tubes sont centrifugés, le surnageant est éliminé à l'aide d'une trompe à vide et le culot est resuspendu dans du tampon phosphate et recentrifugé. Après élimination du surnageant, le culot est analysé dans un compteur LKB Wallac 1277 GammaMaster à passeur d'échantillons.

Une courbe standard allant de 0 à 50 ng/ml est réalisée à l'aide d'₀FSH (réf. NIAMDD-₀FSH-RP-1, AFP 5679C).

La sensibilité du dosage est de 0.08 ng/ml, ses coefficients de variation intra- et inter-essais respectivement de 5.5% et 10.5%.

11.6. Dosage de la LH

Le dosage de la LH est réalisé selon la même méthode que celle utilisée pour le dosage de la FSH.

Les références de l'hormone et de l'anticorps utilisés sont NIADDK-₀LH-I-3 (AFP-9598B) et As LH (réf. NIADDK-anti ₀LH, AFP-192279).

La sensibilité du dosage est de 0.07 ng/ml, ses coefficients de variation intra- et inter-essais respectivement de 7.5% et 10.5%.

11.7.Dosage de la leptine

Le dosage de la leptine est réalisé selon la même méthode que celle utilisée pour le dosage de la FSH.

L'hormone froide utilisée est la Leptine bovine recombinante (réf. DSL-R01708 de chez Diagnostic Systems Laboratories) et l'anticorps utilisé est As Leptine 8172.

La sensibilité du dosage est de 0.83 ng/ml, son coefficient de variation intra-essais de 13% (n=180).

12.Mise en évidence des récepteurs à la leptine par immunohistochimie

12.1.Principe

L'immunohistochimie est une méthode de détection d'une protéine sur une coupe tissulaire ou sur un étalement cytologique. Elle permet la visualisation des antigènes par application séquentielle d'un anticorps spécifique à l'antigène, un anticorps secondaire à l'anticorps primaire, un complexe enzymatique et un substrat chromogénique. L'activation enzymatique du chromogène résulte en un produit de réaction visible au site de l'antigène. L'immunohistochimie est en fait une réaction immunologique *in situ* et son interprétation est associée à une analyse morphologique. Elle est la seule méthode, parmi les autres méthodes immunologiques, permettant de préciser le type de la cellule contenant le signal et la topographie du signal dans la cellule.

Le but de notre expérience est de mettre en évidence les récepteurs à la leptine sur différents tissus reproducteurs, tels que les ovaires et l'utérus, ainsi qu'au niveau du tissu adipeux chez la brebis.

Cependant, il s'agit d'une étude préliminaire dont l'objectif est la mise au point d'une technique d'immunohistochimie sensible pour le récepteur à la leptine. Celle-ci a donc été effectuée sur des prélèvements issus de seulement un animal de deux espèces différentes.

Les tissus sont fixés au formol et inclus en paraffine puisque cette technique garantit une meilleure préservation de la morphologie tissulaire par rapport aux autres méthodes existantes. Cependant, des tissus fixés en cryostat sont prévus dans le cas où la fixation au formol ne donnerait pas de résultats concluants, le formol pouvant dégrader la structure antigénique de certaines protéines.

Une coloration à l'hématoxyline est réalisée sur chaque type de tissu afin de déterminer leur structure.

L'anticorps primaire choisi (réf. Ob-R (B-3) sc-8391 de chez Santa Cruz Biotechnology) est un anticorps monoclonal produit sur souris, dirigé contre un peptide de la portion carboxylique terminale du récepteur de la leptine de souris et concentré à 200 µg/ml.

L'anticorps secondaire (Solution Envision = système d'amplification Dako) est produit sur chèvre et dirigé contre les IgG de souris et lapin. Cet anticorps est couplé à une peroxydase, enzyme qui décompose le H₂O₂ et produit une coloration brune en présence du chromogène, DAB+ (Diaminobenzidine) (réf. Dako Liquid DAB+ substrate-chromogen solution de chez Dako Corporation) (figure 23).

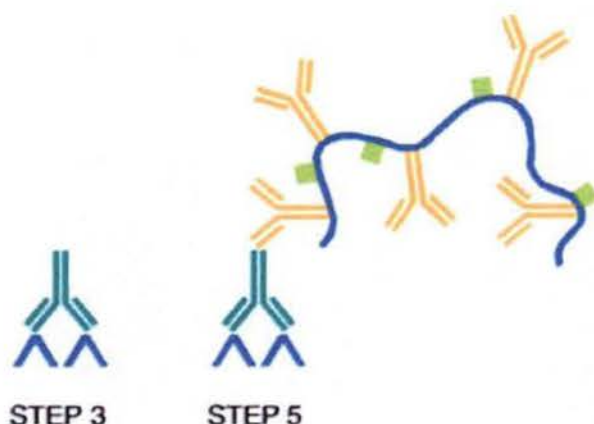


Figure 23 : Système d'amplification Envision.
(<http://www.dakousa.com/ihcbook/hbcontent.htm>)

12.2.Prélèvements tissulaires

Une brebis est euthanasiée par une injection intra-jugulaire de pentothal. Les ovaires, l'utérus et une portion de tissu adipeux sous-cutanés sont prélevés.

12.3.Préparation histologique

Les biopsies sont fixées au formol 4% (24 h.) le plus rapidement possible afin d'éviter l'autolyse tissulaire. Après déshydratation, elles sont incluses dans de la paraffine et sectionnées en coupes d'une épaisseur de 6 µm à l'aide d'un microtome. Les lames sont déparaffinées, réhydratées puis rincées au PBS et soumises à la préparation immunologique.

12.4.Préparation immunologique

La coupe est d'abord traitée, par passage dans un bain d' H_2O_2 -méthanol, afin d'éliminer toute activité peroxydase endogène. Cette activité est, en effet, une propriété commune à toutes les hémoprotéines telles que l'hémoglobine dans les globules rouges, la myoglobine dans les cellules musculaires, le cytochrome dans les granulocytes et monocytes, et les catalases du foie et des reins.

Le premier anticorps est ensuite appliqué sur la coupe.

La révélation et l'amplification sont réalisées par addition du second anticorps couplé à une peroxydase et à un polymère.

Le substrat de la peroxydase est apporté par la DAB+ donnant un pigment brun.

La coupe est ensuite montée en milieu aqueux sous lamelle scellée au vernis à ongle.

12.5.Coloration à l'hématoxyline

Une coupe de chaque type tissulaire est colorée à l'hématoxyline afin d'observer la structure de chacun des tissus prélevés.

12.6.Contrôles

Plusieurs types de contrôles doivent être réalisés afin de vérifier la spécificité des anticorps utilisés.

Un premier contrôle négatif consiste à traiter le tissu de la même façon que les autres, mais en remplaçant l'anticorps primaire par du PBS. Ce contrôle ne doit présenter aucun marquage si l'anticorps secondaire ne réagit pas avec les structures tissulaires.

Un second contrôle négatif consiste à pré-adsorber l'anticorps avec l'antigène qui a servi à produire l'anticorps primaire. L'antigène bloque les sites de liaison spécifiques de l'anticorps et le complexe formé est éliminé lors du rinçage du tissu. L'anticorps secondaire ne pourra donc plus se fixer sur le primaire et il n'y aura pas de marquage. Un marquage positif signifierait que l'anticorps primaire réagit avec d'autres antigènes tissulaires via d'autres sites, résultant en une fixation non spécifique malgré le blocage au niveau du site spécifique par l'antigène.

13. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel de statistique S-plus.

Les coefficients de corrélation ont été recherchés entre les différents paramètres étudiés. Les différences significatives ont ensuite été testées par le modèle ANOVA et le test T. Les données non paramétriques ont été analysées par un test de Wilcoxon . La différence des moyennes de fertilité en fonction des groupes ont été recherchées par un test de χ^2 . Une valeur de $P < 0.05$ indique une différence significative entre les paramètres testés.

Chapitre V:

Résultats

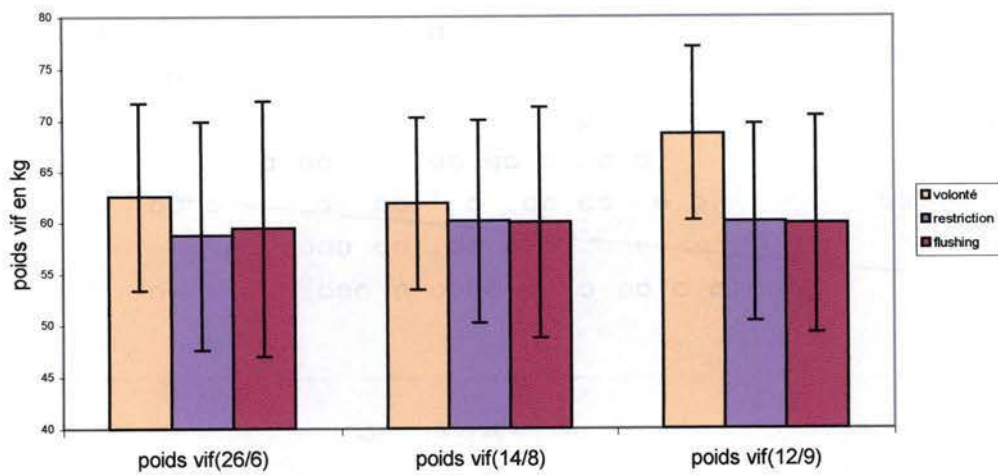


Figure 24 : poids vif au cours du temps en fonction des groupes.

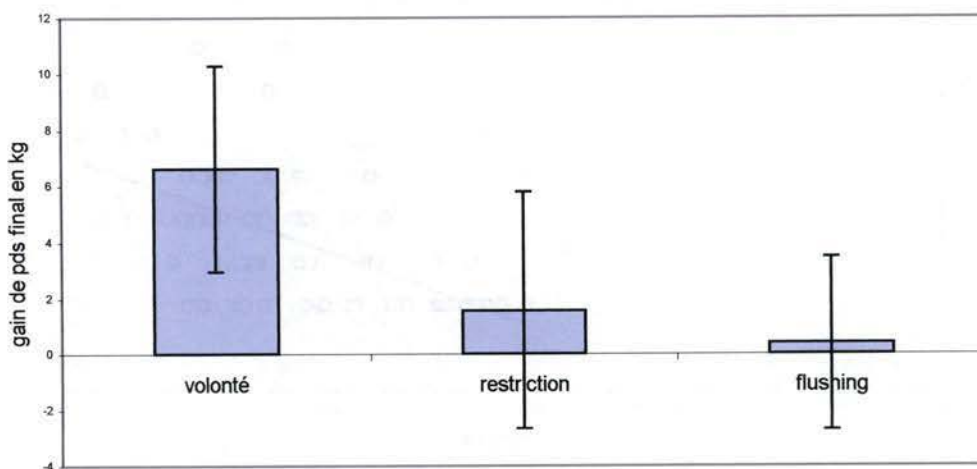


Figure 25 : gain de poids final en fonction des groupes.

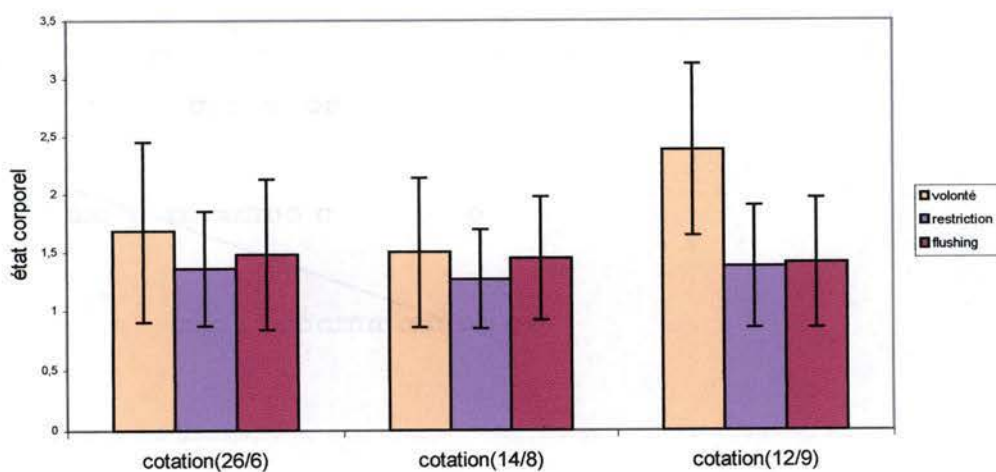


Figure 26 : état corporel au cours du temps en fonction des groupes.

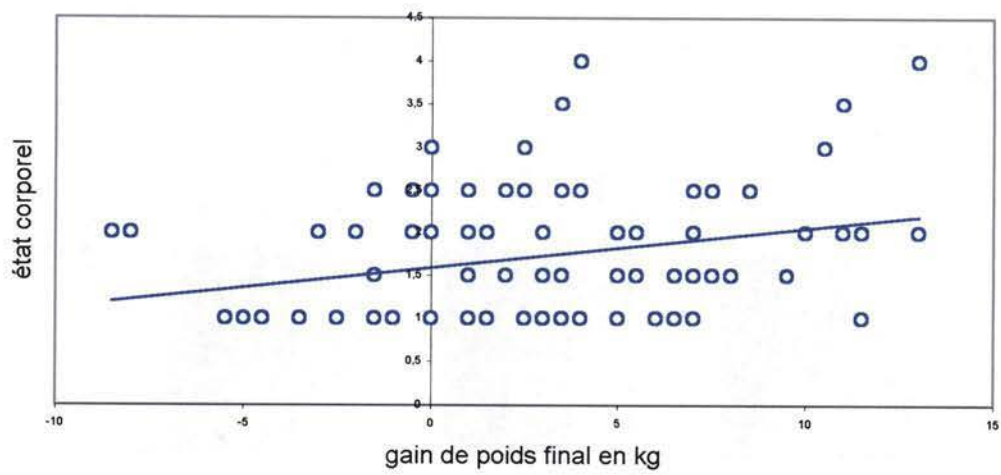


Figure 27 : état corporel en fonction du gain de poids final.

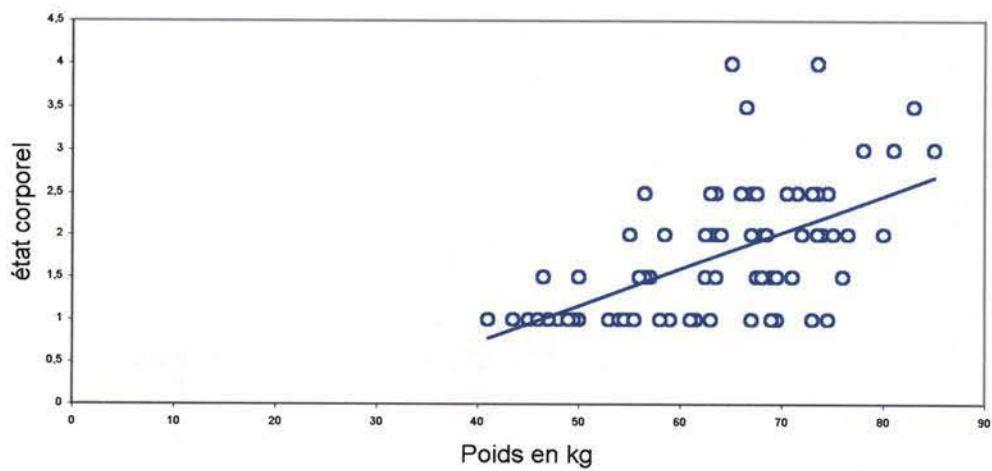


Figure 28 : état corporel en fonction du poids vif (le 12 septembre).

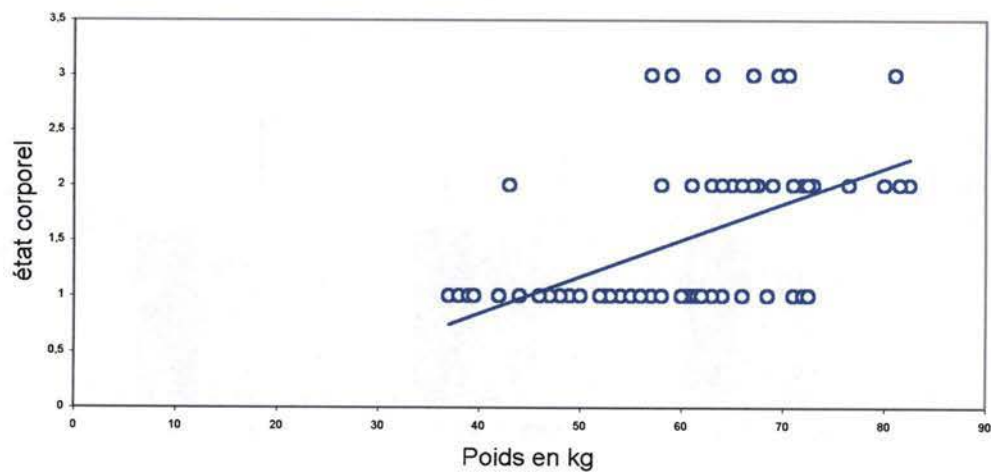


Figure 29 : état corporel en fonction du poids vif (le 26 juin).

1. Etat corporel, taux d'ovulation et fécondité

Pour rappel, l'expérience débute réellement le 26 juin par la répartition de 83 brebis en deux groupes. Le groupe 1 contient les brebis qui sont nourries à volonté jusqu'à la fin de l'expérience, le groupe 2 contient les brebis soumises à une restriction alimentaire. Le 14 août, la moitié des brebis du groupe 2 sont retirées afin de constituer le groupe 3 et reçoivent un flushing jusqu'à la fin de l'expérience. L'autre moitié reste dans le groupe 2 et les animaux subissent la restriction alimentaire jusqu'à la fin de l'expérience.

Les brebis sont soumises à une prise de sang, à une évaluation de leur état corporel et à une pesée les 26 juin, 14 août et 12 septembre.

L'annexe 4 rassemble les données individuelles des brebis des trois groupes pour les poids vifs, la cotation de l'état corporel, les gains de poids et les taux d'ovulation évalués par endoscopie.

Les moyennes de poids vifs enregistrées aux trois dates pour les trois groupes sont de 62.5, 61.8, 68.6 kg pour le groupe 'volonté', 58.7, 60.1, 60 kg pour le groupe 'restriction' et 59.4, 60, 59.8 kg pour le groupe 'flushing' (figure 24).

Les moyennes de gain de poids final calculées entre la dernière et la première pesée pour les groupes 'volonté' et 'restriction' et au cours du flushing pour le groupe 'flushing' sont de 6.6, 1.6 et 0.4 kg respectivement (figure 25). On observe une différence significative dans la prise de poids entre les groupes 'volonté' et 'restriction' ($P < 0.05$) et 'volonté' et 'flushing' ($P < 0.05$), mais pas entre les groupes 'restriction' et 'flushing' ($P > 0.05$).

Les moyennes d'état corporel au cours du temps pour les trois groupes sont de 1.7, 1.5, 2.4 pour le groupe 'volonté', 1.4, 1.3, 1.4 pour le groupe 'restriction' et 1.5, 1.4, 1.4 pour le groupe 'flushing' (figure 26). On observe une différence significative de l'état corporel évalué en fin d'expérience (12 septembre) entre les groupes 'volonté' et 'flushing' et 'volonté' et 'restriction' ($P < 0.05$), mais non significative entre les groupes 'restriction' et 'flushing' ($P = 0.8$). Il n'y a pas de différence significative d'état corporel mesuré en début d'expérience (7 juillet) entre les groupes 'volonté' et 'restriction' ($P = 0.16$), 'restriction' et 'flushing' ($P = 0.8$) et 'volonté' et 'flushing' ($P = 0.3$), ni pour l'état corporel évalué en milieu d'expérience (14 août) entre les groupes 'volonté' et 'restriction' ($P = 0.28$), 'restriction' et 'flushing' ($P = 0.42$) et 'volonté' et 'flushing' ($P = 0.75$).

L'état corporel augmente avec le gain de poids, ces deux paramètres étant mesurés en fin d'expérience (figure 27). On observe une corrélation faible, mais significative, entre ces deux paramètres ($r = 0.27$, $P < 0.05$).

L'état corporel augmente aussi avec le poids en kg (figure 28). Les animaux lourds ont un indice d'état corporel élevé, donc il existe un lien entre l'état corporel et le poids en kg ($r = 0.58$, $P < 0.05$), même s'il est masqué par la différence de gabarit entre les races utilisées. Cette relation est confirmée par le graphe de la figure 29 montrant une corrélation significative entre les mêmes paramètres mesurés au début de l'expérience ($r = 0.55$, $P < 0.05$).

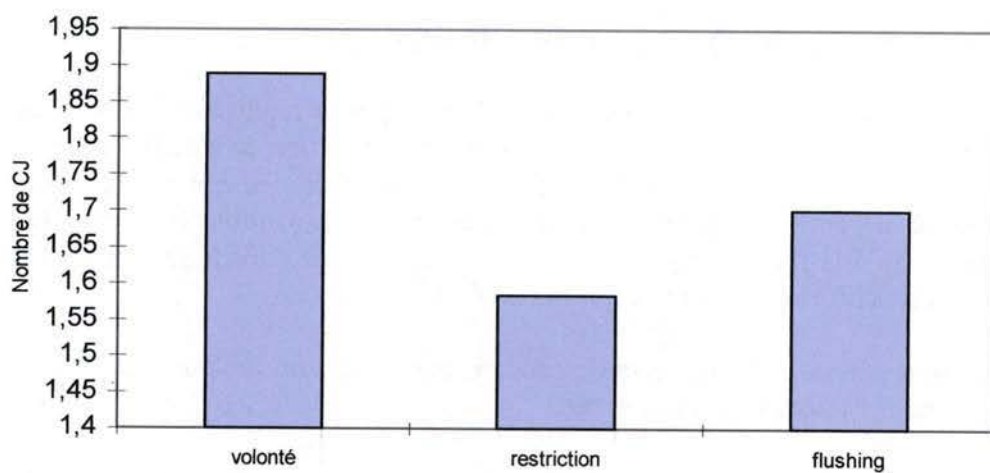


Figure 30 : taux d'ovulation en fonction des groupes.

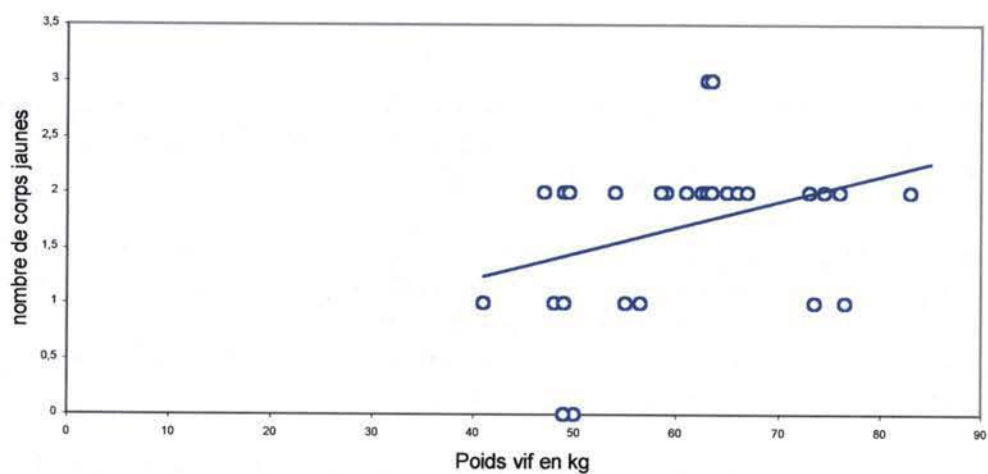


Figure 31 : taux d'ovulation en fonction du poids vif.

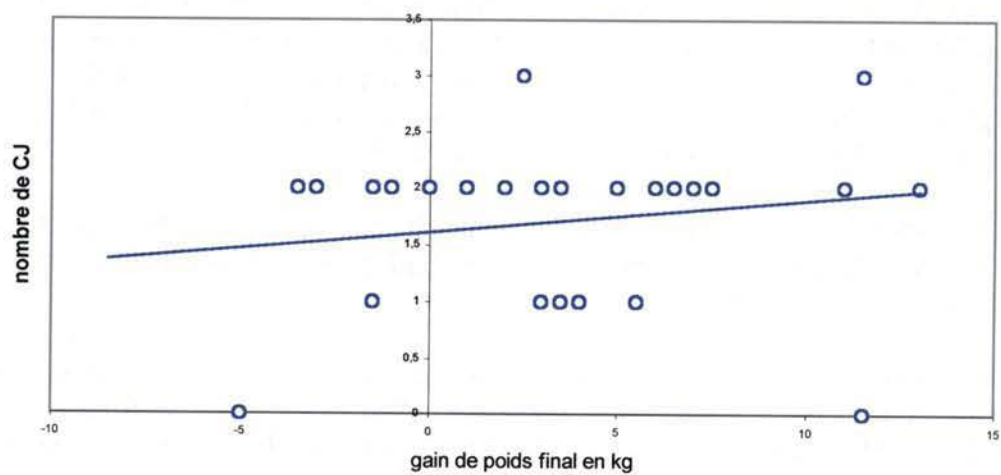


Figure 32 : taux d'ovulation en fonction du gain de poids final.

Le nombre de corps jaunes varie en fonction des groupes. Le nombre moyen observé pour les groupes 'volonté', 'restriction' et 'flushing' est de 1.89, 1.58 et 1.70 respectivement (figure 30). Cependant, on n'observe pas de différence significative entre les groupes. Cela pourrait provenir du fait que le nombre de brebis ayant subi les endoscopies est faible (n=9 pour le groupe 1 ; n=12 pour le groupe 2 ; n=10 pour le groupe 3).

Le nombre de corps jaunes varie avec le poids vif en kg (figure 31). Il existe une corrélation positive entre ces deux facteurs ($r=0.35$).

Le nombre de corps jaunes augmente avec le gain de poids final en kg et l'état corporel (figure 32 et 33). Les coefficients de corrélation sont faibles entre le nombre de corps jaunes et le gain de poids ($r=0.22$) et entre le nombre de corps jaunes et l'état corporel ($r=0.27$).

Le taux d'ovulation par race a été étudié sur les races Suffolk laitier (SL) et Texel (T) (figure 34). Le nombre moyen de corps jaunes observé chez les brebis SL est de 2 pour le groupe 'volonté' (n=4), 2.3 pour le groupe 'restriction' (n=3) et 1.7 pour le groupe 'flushing' (n=4). Chez les brebis T, il est de 1.5 pour le groupe 'volonté' (n=2), 1 pour le groupe 'restriction' (n=4) et 2 pour le groupe 'flushing' (n=2).

Les agnelages et le relevé des jeunes des brebis qui ont été inséminées ont permis d'étudier la fertilité, la prolificité et la fécondité de celles-ci. Ces paramètres ont été calculés de deux manières différentes.

Un premier calcul a été fait à partir des données obtenues pour les brebis qui ont été fécondées au premier cycle uniquement. Les valeurs de fertilité, prolificité et fécondité obtenues dans cette condition sont les suivantes (figure 35).

La fertilité est calculée par le pourcentage du nombre de brebis parturientes sur le nombre de brebis mises à la lutte. Il est de 22% pour le groupe 'volonté', 4% pour le groupe 'restriction' et 33% pour le groupe 'flushing' (0.22, 0.04 et 0.33 sur le graphe). On observe une différence significative entre les trois groupes ($P<0.05$) et entre les groupes 'volonté' et 'restriction', 'restriction' et 'flushing' ($P<0.05$), mais pas entre les groupes 'volonté' et 'flushing' ($P>0.05$).

La prolificité est calculée par le rapport du nombre de jeunes sur le nombre de brebis qui ont agnelé. Il est de 1.86 pour le groupe 'volonté', 2.0 pour le groupe 'restriction' et 1.83 pour le groupe 'flushing'. Une différence entre les groupes a pu être mise en évidence entre les groupes 'volonté' et 'flushing' ($P=0.05$), mais l'analyse statistique n'a pas pu être réalisée entre les autres groupes, car une seule brebis du groupe 'restriction' rentre dans le calcul.

La fécondité est calculée par le pourcentage du nombre de jeunes nés sur le nombre de brebis mises à la lutte. Il est de 42% pour le groupe 'volonté', 8.3% pour le groupe 'restriction' et 61% pour le groupe 'flushing'. On observe une différence significative entre les groupes 'volonté' et 'restriction', 'restriction' et 'flushing' ($P<0.05$), mais pas entre les groupes 'volonté' et 'flushing' ($P>0.05$).

Le nombre de brebis fécondées par l'insémination étant faible, un second calcul de la fertilité, la prolificité et la fécondité a été effectué en considérant les brebis inséminées, ainsi que les brebis qui ont été fécondées au cycle suivant par le bélier entier. Dans ce cas, les valeurs sont les suivantes.

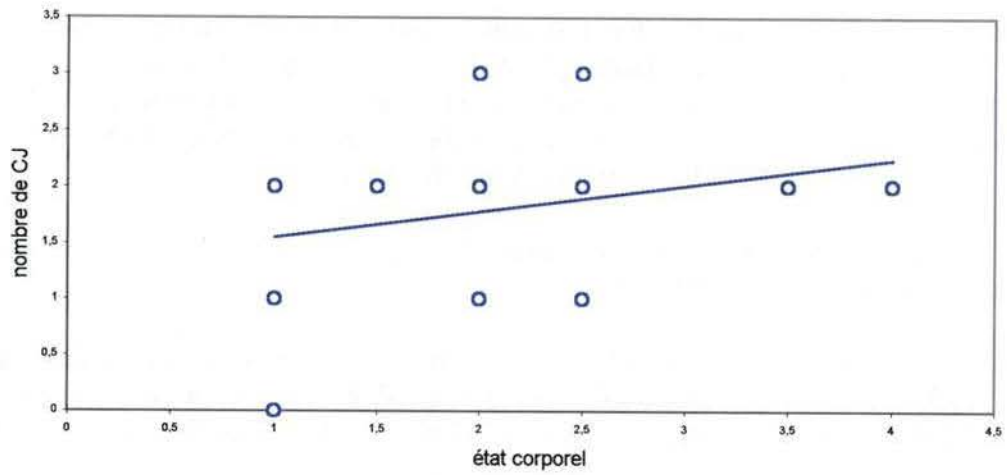


Figure 33 : taux d'ovulation en fonction de l'état corporel.

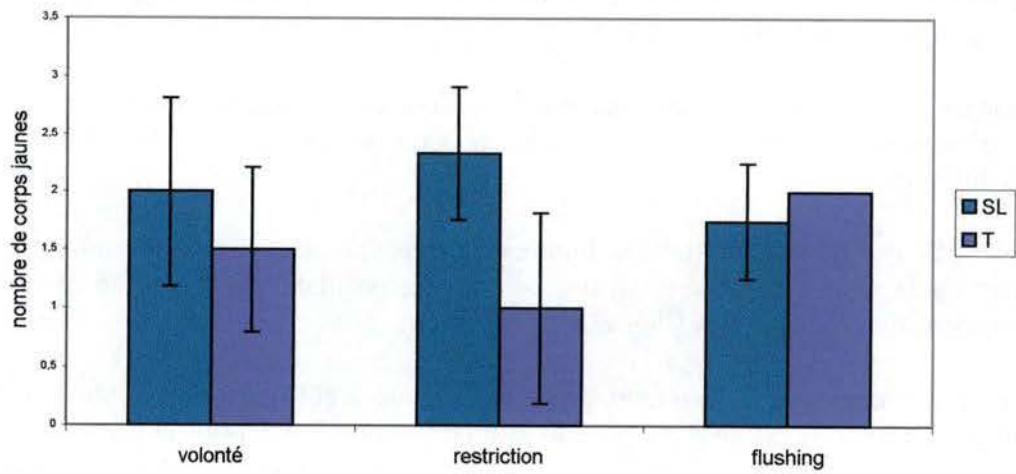


Figure 34 : taux d'ovulation par race.

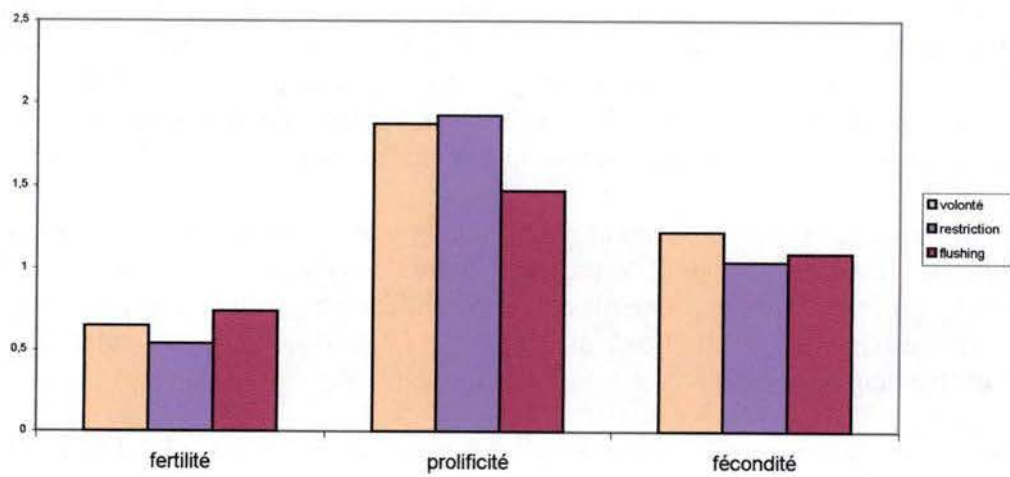


Figure 35 : fécondité, fertilité et prolificité en fonction des groupes.

La fertilité est de 65%, 54% et 74% (0.65, 0.54 et 0.74 sur le graphe) pour les groupes 'volonté', 'restriction' et 'flushing' respectivement. On n'observe pas de différence significative entre les trois groupes ($P>0.05$).

La prolificité est de 1.87, 1.92 et 1.47 pour les groupes 'volonté', 'restriction' et 'flushing' respectivement. On n'observe pas de différence significative entre les trois groupes ($P=0.13$), ni entre les groupes 'volonté' et 'restriction' ($P>0.05$), 'restriction' et 'flushing' ($P=0.11$) et 'volonté' et 'flushing' ($P=0.15$).

La fécondité est de 122%, 104% et 109% pour les groupes 'volonté', 'restriction' et 'flushing' respectivement. On n'observe pas de différence significative entre les groupes ($P>0.05$).

La prolificité est corrélée avec le taux d'ovulation pour les groupes 'volonté' et 'restriction', mais pas pour le groupe 'flushing' ($r=0.40$, $r=0.33$ et $r=-0.15$ respectivement).

2.Expression de l'ARNm de la leptine au niveau du tissu adipeux

2.1.Extraction de l'ARN : dosage

Vingt brebis ont subi une biopsie de tissu adipeux afin de quantifier l'expression de l'ARNm de la leptine.

Les prélèvements ont été pesés avant l'extraction afin d'extraire l'ARN total à partir d'une même quantité de tissu (200 mg). Cependant, la quantité d'ARN total varie d'un échantillon à un autre, car la proportion de tissu adipeux par rapport au tissu conjonctif contenu dans l'échantillon et la quantité de graisse contenue dans le tissu adipeux dépendent de l'état corporel de l'animal et de l'échantillon prélevé. Un dosage de l'ARN total obtenu après extraction à partir de chaque échantillon est alors effectué afin d'évaluer sa concentration. L'estimation de la concentration en ARNm total est essentielle, puisque une quantité égale d'ARN total doit être utilisée pour la RT-PCR compétitive afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux.

Les résultats obtenus pour la quantité d'ARNm total sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Estimation de la quantité d'ARNm total pour chaque échantillon.

Groupes	N°brebis	Dosage (µg/µl)	A260	A280	Rapport A260/A280
Volonté					
	109	1.320	0.035	0.020	1.750
	2018	1.280	0.032	0.017	1.882
	2032	1.280	0.032	0.018	1.722
	179	1.960	0.049	0.024	2.042
	TSN	1.920	0.048	0.022	2.182
	2096	1.320	0.033	0.015	2.200
	2016	3.440	0.086	0.048	1.792
moyenne		1.780			
Restriction					
	7422	2.000	0.044	0.029	1.913
	5700	2.800	0.070	0.034	2.059
	0111	1.560	0.038	0.019	2.000
	4469	1.160	0.027	0.014	1.929
	4567	1.280	0.032	0.015	2.133
moyenne		1.760			
Restriction- flushing					
	5560	1.800	0.046	0.021	2.190
	7444	0.880	0.022	0.012	1.833
	5601	2.680	0.064	0.034	1.882
	4490	1.480	0.037	0.017	2.176
	5555	2.000	0.053	0.026	2.038
	113	2.280	0.057	0.032	1.781
	5506	1.080	0.027	0.016	1.688
	7309	2.560	0.064	0.036	1.777
moyenne		1.845			

Les moyennes calculées pour les groupes 'volonté', 'restriction' et 'flushing' sont de 1.780, 1.760 et 1.845 µg/µl respectivement. On n'observe pas de différence significative entre les trois groupes, ni entre les groupes pris deux à deux ($P>0.05$).

Le rapport des mesures d'absorbance permet d'estimer la pureté de l'ARN. Dans ce cas, les valeurs sont situées entre 1.7 et 2.2 indiquant que l'ARN extrait est pur, puisque, comme c'est indiqué dans le point 5 du chapitre IV, un rapport de 2 signifie que l'ARN est pur.

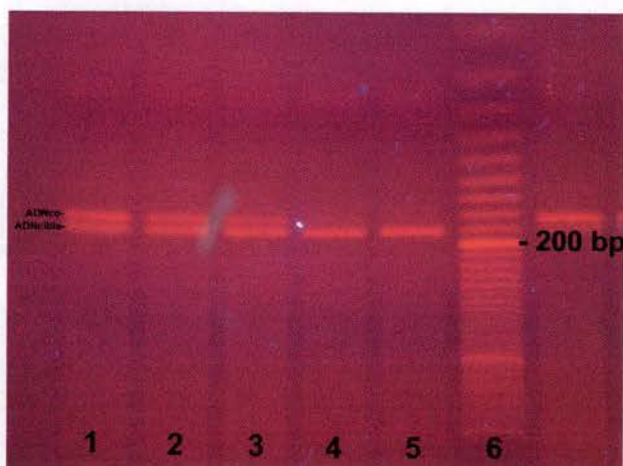


Figure 36 : image obtenue après RT-PCR compétitive sur un échantillon de la brebis N°7444 soumise au flushing.

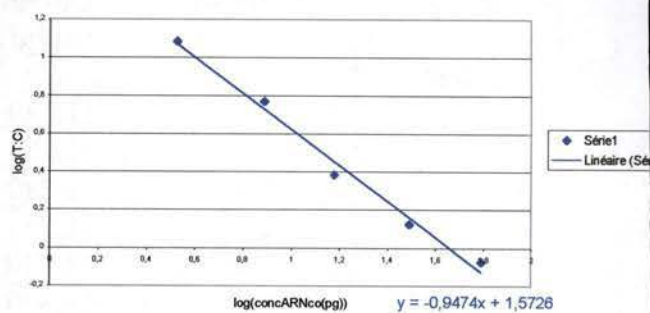


Figure 37 : droite de régression relative à la figure 36.

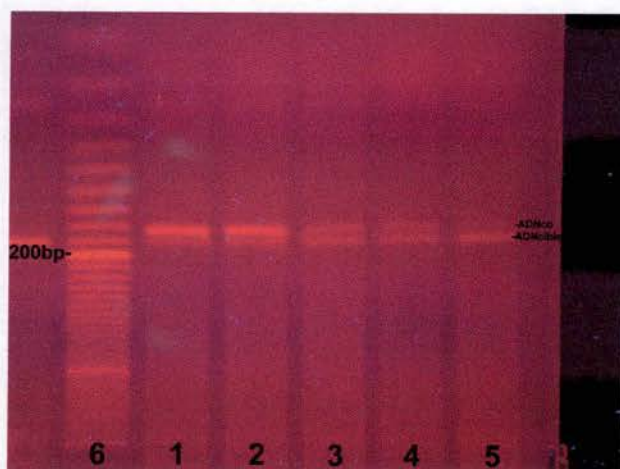


Figure 38 : image obtenue après RT-PCR compétitive sur un échantillon de la brebis N°111 mise en restriction.

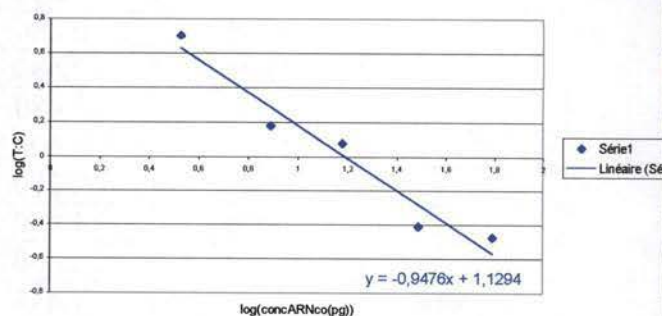


Figure 39 : droite de régression relative à la figure 38.

2.2.Mise au point de la technique de RT-PCR quantitative compétitive

Le taux d'ARNm de la leptine a été étudié par RT-PCR compétitive pour toutes les biopsies.

Les photos représentées en figures 36 et 38 sont obtenues après RT-PCR compétitive avec de l'ARN extrait à partir de tissus prélevés sur des brebis soumises au flushing et à la restriction respectivement. La bande 6 contient le standard de fragments d'ADN de taille connue. Celui-ci est constitué de 50 fragments d'ADN distants de 20 bp. Les bandes 1 à 5 contiennent chacune deux bandes d'ADN. La bande supérieure, située à 165 bp, est celle de l'ADN compétiteur dont l'ARN de départ est en concentration connue de 62 pg, 31 pg, 15.15 pg, 7.75 pg et 3.375 pg pour les bandes 1 à 5 respectivement. La bande inférieure, située à 183 bp, est celle de l'ADN cible provenant de 2 µg d'ARN total de départ pour chaque essai. On observe sur ces photos que plus l'ARN compétiteur est dilué, plus l'intensité des bandes d'ADN cible augmente, tandis que celle des bandes d'ADN compétiteur diminue. On remarque aussi que l'ADN cible sur la photo de la figure 36 est plus concentré que celui sur la photo de la figure 38.

Les graphes des figures 37 et 39 représentent le logarithme du rapport (T/C), où T=ADN cible et C=ADN compétiteur, en fonction de la concentration en ARN compétiteur de départ. Les points obtenus permettent de tracer une droite de régression. L'équation de cette droite permet de calculer la concentration en ARN cible qui est la concentration à laquelle le rapport (T/C) = 1. Les équations des droites de régression tracées sur ces graphes donnent des concentrations en ARN cible de départ égales à 45.7 pg et 15.55 pg respectivement. Ces résultats coïncident avec les observations faites à partir des images. En effet, on peut observer que les bandes d'ADN cible et compétiteur sont de même intensité entre les bandes 1 et 2 pour la photo de la figure 36 et au niveau de la bande 3 pour la photo de la figure 38.

L'ensemble des photographies numériques classées par groupe et par numéro de brebis sont présentées en annexe 5 (la photo correspondant à l'échantillon prélevé sur la brebis N°179 contient une bande supplémentaire correspondant à une concentration en ARN compétiteur égale à 500 fg).

Les analyses graphiques sont quant à elles présentées en annexe 6.

Les valeurs de concentration en ARN cible de départ ainsi que les moyennes obtenues pour chaque groupe sont indiquées dans le tableau 5. Ces valeurs seront analysées au point 2.4.

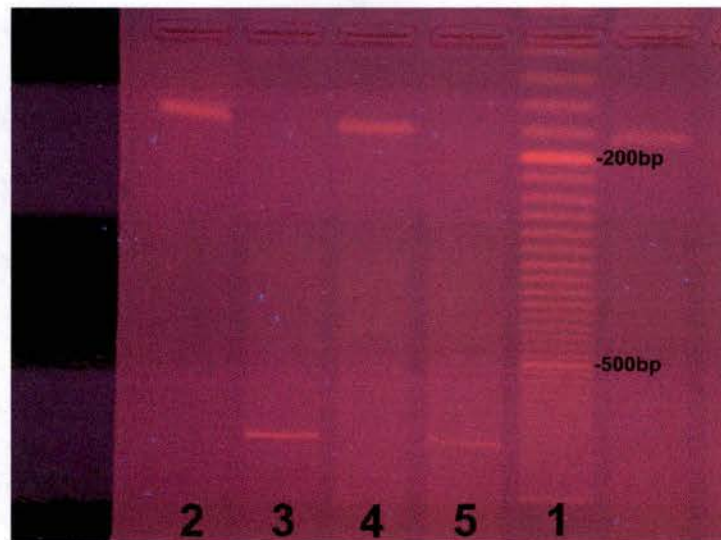


Figure 40 : image obtenue après RT-PCR semi-quantitative sur un échantillon des brebis N°113 (bandes 2 et3) et N°5601 (bandes 4 et5) soumises au flushing.

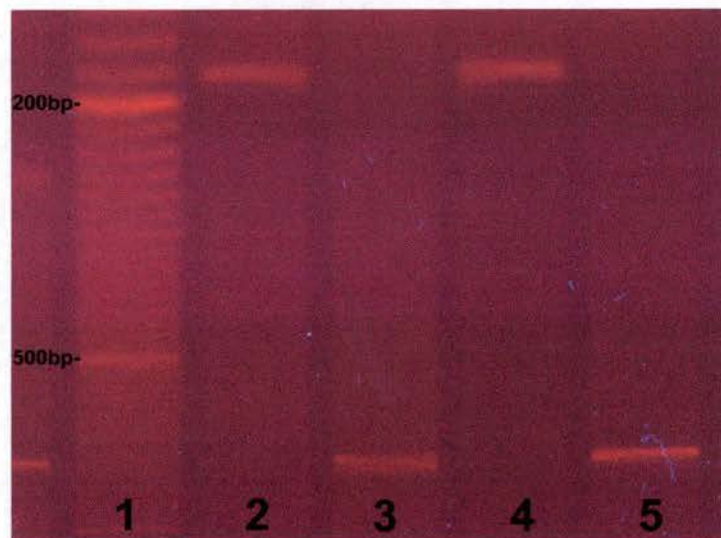


Figure 41 : image obtenue après RT-PCR semi-quantitative sur un échantillon des brebis N°111 (bandes 2 et 3) et N°4469 (bandes 4 et 5) mises en restriction.

Tableau 5 : Comparaison des valeurs obtenues pour les deux méthodes.

Groupes	N°brebis	Concentration en ARNm (en pg)	Rapport leptine/ β -actine
volonté	109	39.85	2
	2018	22.07	1.8
	2032	37.93	3.7
	179	14.28	
	TSN	23.52	
	2096	30.47	
	2016	19.99	
moyenne		26.87	2.5
restriction	7422	24.41	
	5700	10.16	
	111	15.55	0.81
	4469	31.97	0.87
	4567	21.46	
	7444	45.70	
moyenne		20.71	0.84
restriction-flushing	5560	48.18	0.83
	5601	23.14	3.65
	4490	60.25	
	5555	30.03	7.7
	113	42.88	2.2
	5506	28.28	
	7309	42.27	
moyenne		40.09	4.95

2.3.RT-PCR semi-quantitative

Le taux d'expression de l'ARNm de la leptine pour neuf échantillons de tissu adipeux a été étudié par RT-PCR semi-quantitative et comparé avec celui obtenu par la méthode compétitive. L'analyse du gel par le programme NIH permet de déterminer l'intensité des bandes d'ADN de la β -actine et de la comparer avec celle de la leptine.

Les photos représentées en figures 40 et 41 sont obtenues après RT-PCR semi-quantitative avec de l'ARN extrait à partir de tissus prélevés sur des brebis soumises au flushing et à la restriction respectivement. La bande 1 contient le standard de fragments d'ADN de taille connue. Celui-ci est constitué de 50 fragments d'ADN distants de 20 bp. Les bandes 2 et 4 contiennent les bandes d'ADN de leptine de deux échantillons différents. Les bandes 3 et 5 contiennent les bandes d'ADN de β -actine relatives aux bandes 2 et 4 respectivement. La bande d'ADN de leptine se situe à 183 bp, tandis que celle de β -actine se situe à 688 bp. Sur la photo de la figure 40, on observe que l'intensité des bandes de leptine est beaucoup plus forte que celle des bandes de β -actine et cette différence d'intensité est plus marquée pour l'échantillon issu de la brebis N°5601 (bandes 4 et 5) par rapport à l'échantillon issu de la brebis N°113 (bandes 2 et 3). Sur la photo de la figure 41, on observe aussi une différence

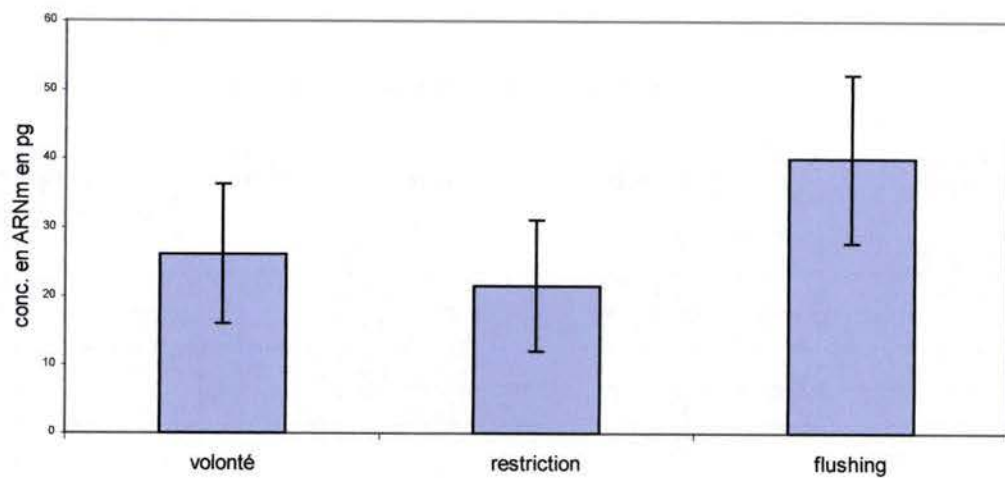


Figure 42 : concentration en ARNm de leptine en fonction des groupes.

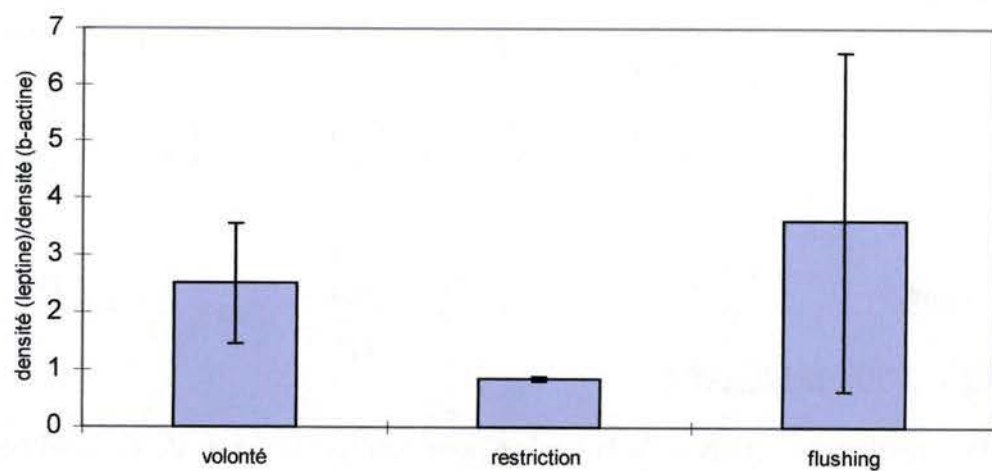


Figure 43 : rapport de densité leptine/ β -actine en fonction des groupes.

d'intensité entre les bandes de leptine et de β -actine, mais c'est celle de la bande de β -actine qui est la plus forte. Le calcul du rapport de densité entre les bandes de leptine et de β -actine coïncide avec ces observations.

Le rapport de densité obtenu pour chaque échantillon testé est aussi indiqué dans le tableau 5.

2.4.Comparaison des deux méthodes

Le tableau 5 permet également de comparer les deux méthodes.

La concentration en ARNm de leptine mesurée par la méthode compétitive varie en fonction des groupes (figure 42). On observe une différence du taux d'expression entre les groupes. Celle-ci est significative entre les groupes 'restriction' et 'flushing' et entre les groupes 'volonté' et 'flushing' ($P < 0.05$), mais non significative entre les groupes 'volonté' et 'restriction' ($P = 0.27$).

Le rapport des densités leptine/ β -actine en fonction des groupes (figure 43), montre que l'estimation du taux d'ARNm de leptine par la méthode semi-quantitative va dans le même sens que l'estimation par la méthode compétitive vis-à-vis des groupes. Cependant, cette estimation du taux d'expression par la méthode semi-quantitative a été réalisée sur un petit nombre d'échantillons et ne permet donc pas de voir une différence significative entre les trois groupes.

Les résultats obtenus par la technique de RT-PCR compétitive mise au point et leur comparaison avec les résultats obtenus par la méthode semi-quantitative classique indiquent que celle-ci peut être validée. De plus, les réactions de compétition et les analyses d'images répétées plusieurs fois sur la plupart des échantillons ont permis de vérifier la reproductibilité de la méthode.

2.5.Relation entre le taux d'ARNm de leptine et les différents paramètres étudiés

La concentration en ARNm de leptine dans le tissu adipeux augmente avec l'état corporel, le poids vif et le gain de poids (figures 44 à 46). Cependant, on n'observe pas de différence significative ($P > 0.05$).

On observe une augmentation du nombre de corps jaunes en fonction de la concentration en ARNm (figure 47). La variance du nombre de corps jaunes s'explique à 55% par la variance de la concentration en ARNm, mais la différence n'est pas significative ($P = 0.15$).

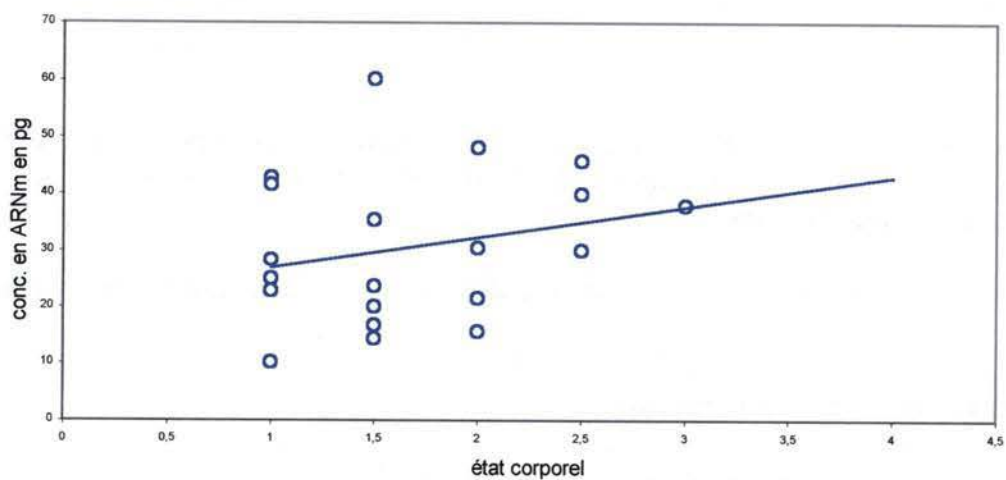


Figure 44 : concentration en ARNm de leptine en fonction de l'état corporel.

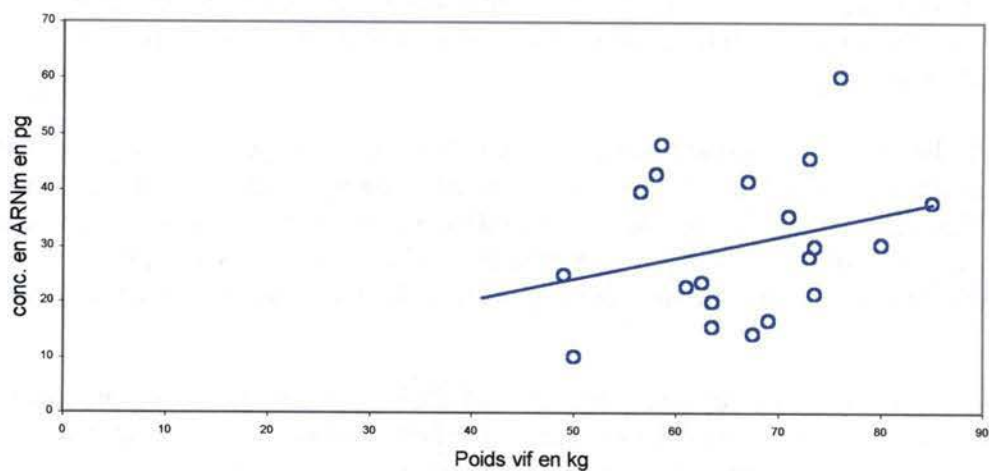


Figure 45 : concentration en ARNm de leptine en fonction du poids vif.

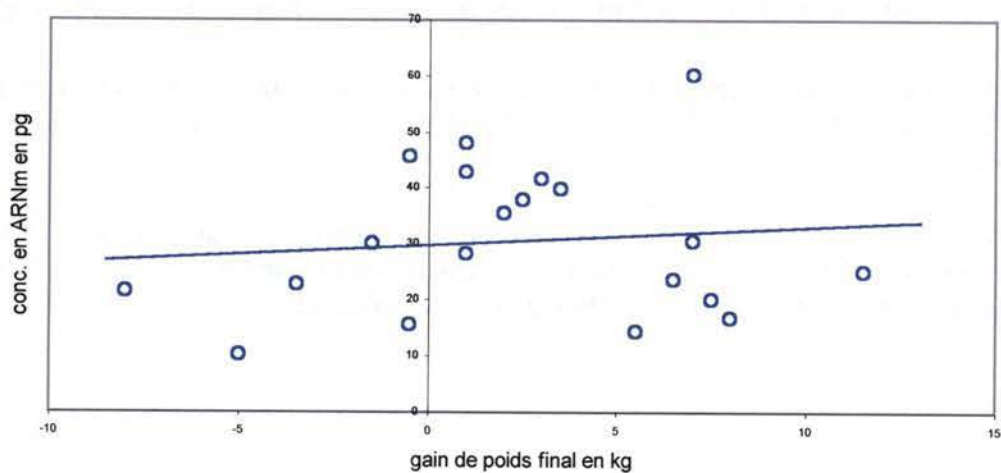


Figure 46 : concentration en ARNm de leptine en fonction du gain de poids final.

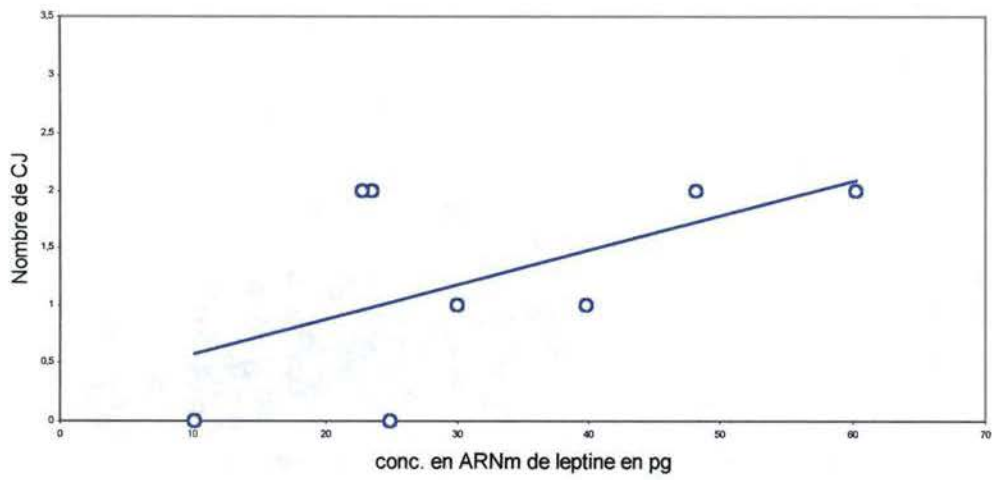


Figure 47 : nombre de corps jaunes en fonction de la concentration en ARNm de leptine.

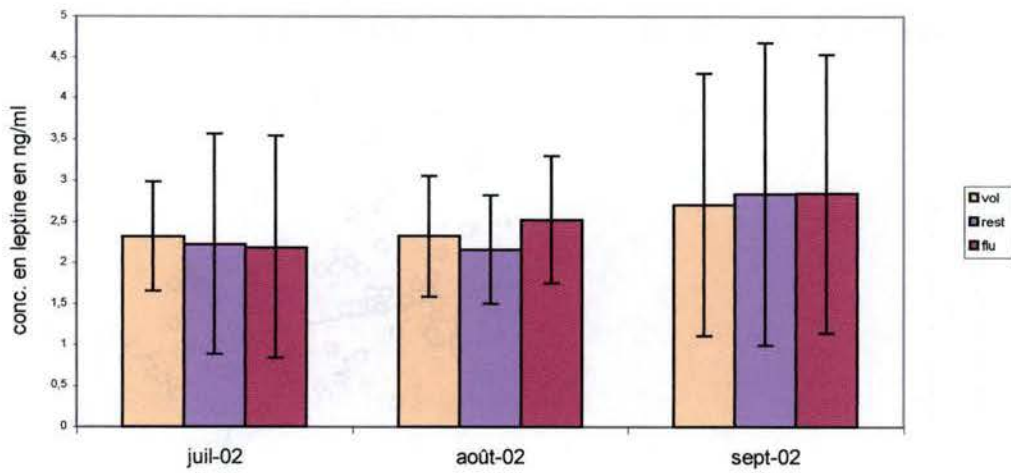


Figure 48 : leptinémie au cours du temps dans les trois groupes.

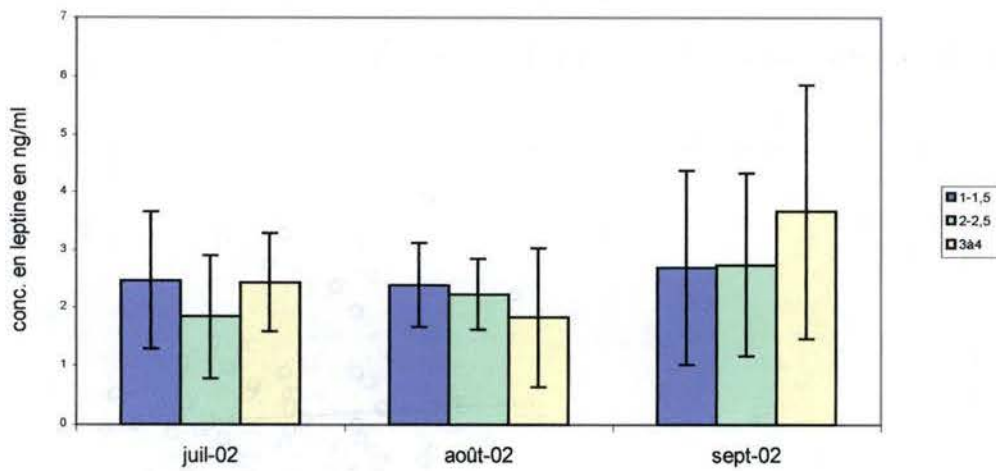


Figure 49 : leptinémie au cours du temps en fonction de l'état corporel.

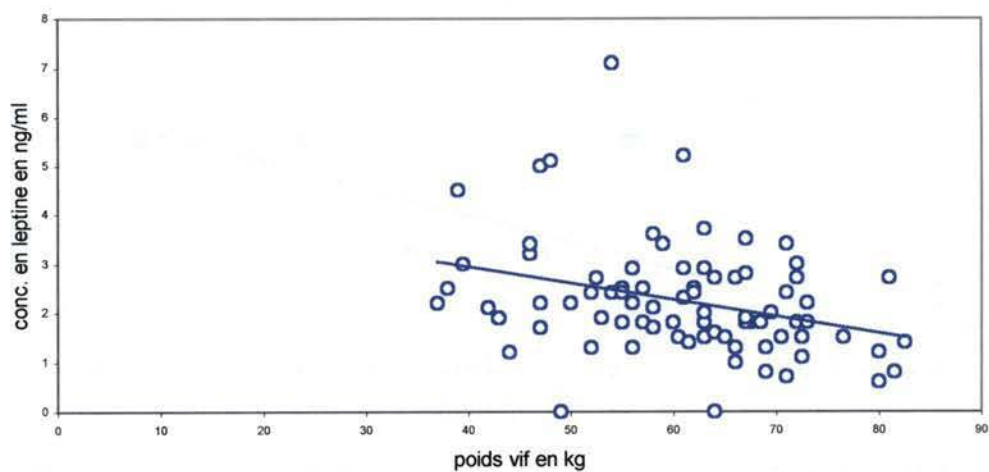


Figure 50 : leptinémie en fonction du poids vif (le 6 juillet).

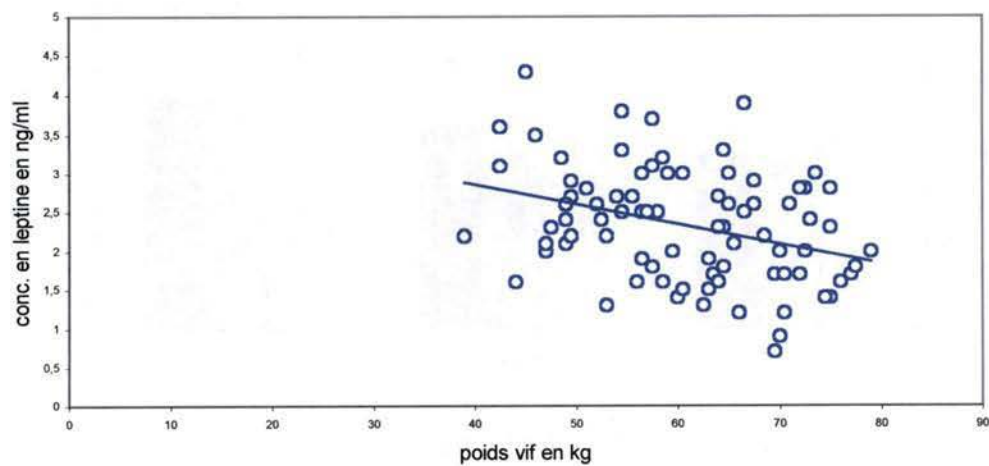


Figure 51 : leptinémie en fonction du poids vif (le 14 août).

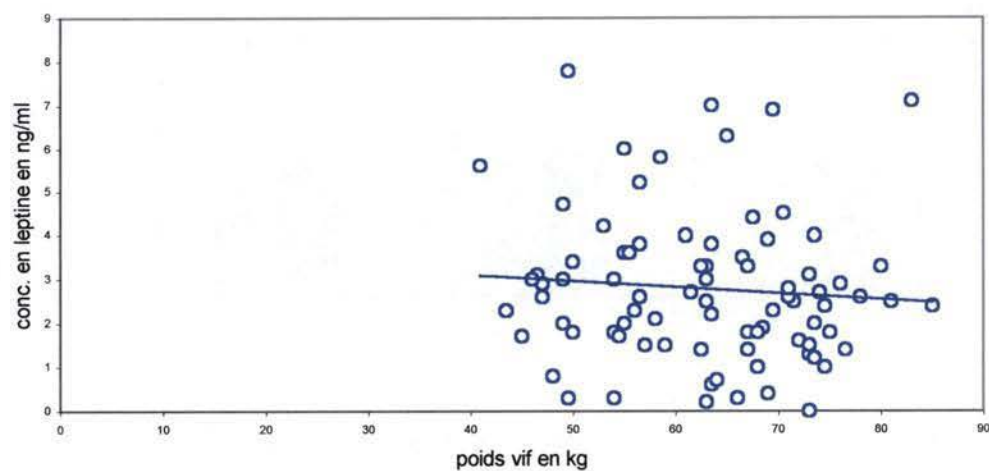


Figure 52 : leptinémie en fonction du poids vif (le 12 septembre).

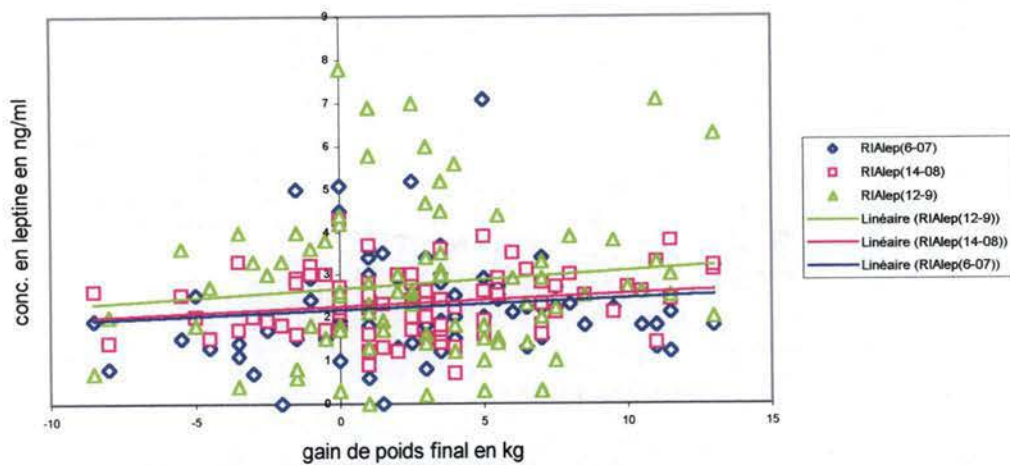


Figure 53 : leptinémie en fonction du gain de poids final.

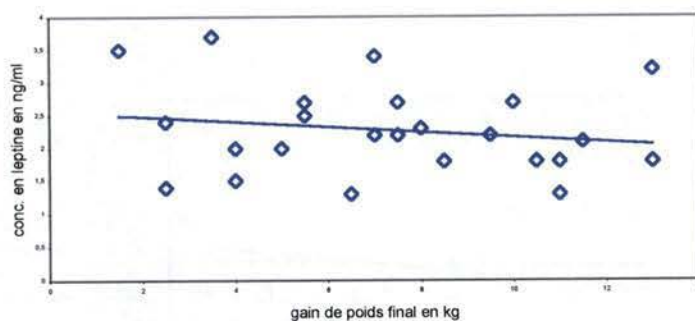


Figure 54 : leptinémie de départ en fonction du gain de poids final pour le groupe volonté.

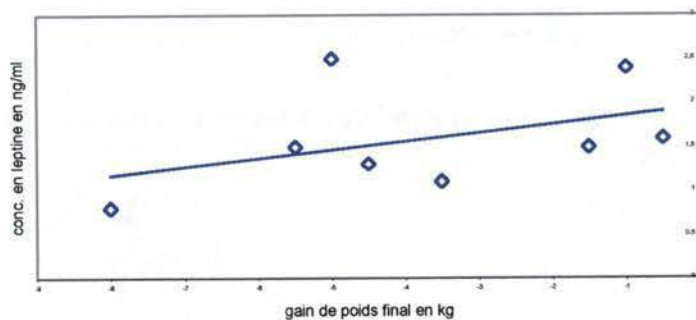


Figure 55 : leptinémie de départ en fonction du gain de poids final pour le groupe restriction.

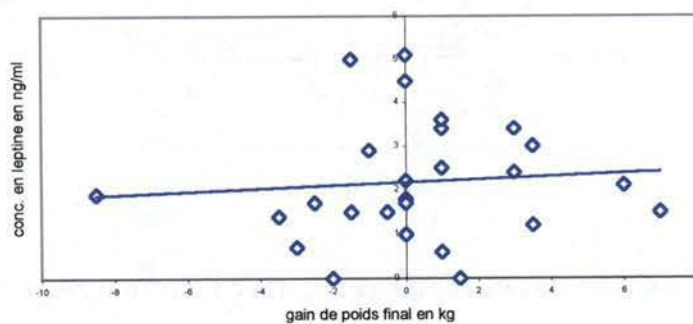


Figure 56 : leptinémie de départ en fonction du gain de poids final pour le groupe flushing.

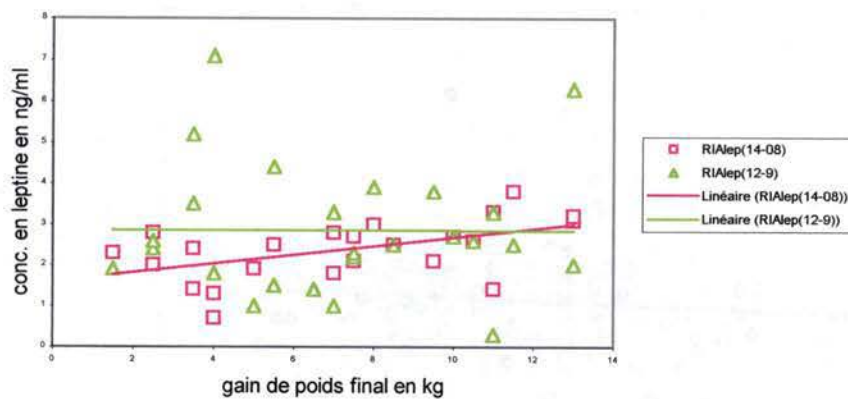


Figure 57 : leptinémie mesurée aux deux dernières dates en fonction du gain de poids final pour le groupe volonté.

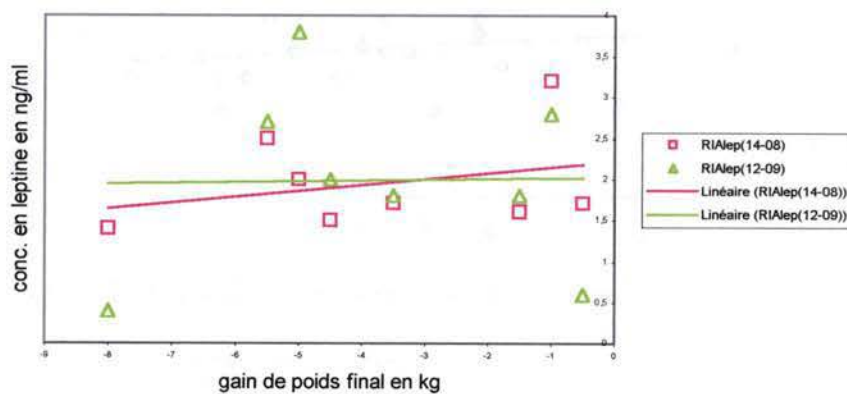


Figure 58 : leptinémie mesurée aux deux dernières dates en fonction du gain de poids final pour le groupe restriction.

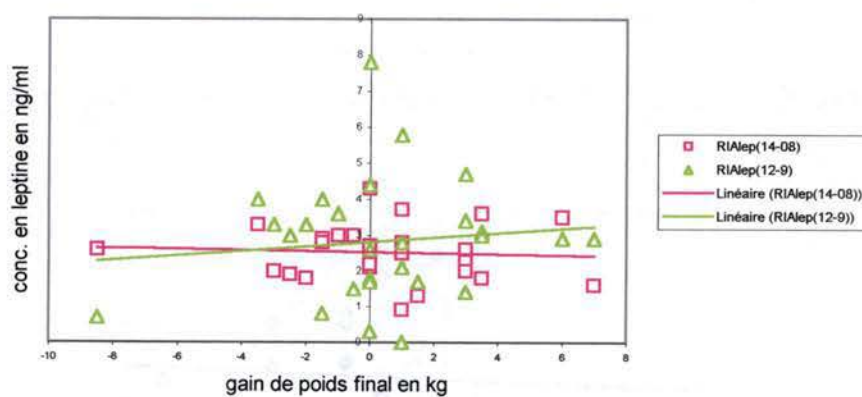


Figure 59 : leptinémie mesurée aux deux dernières dates en fonction du gain de poids final pour le groupe flushing.

3. Dosages R.I.A.

Les résultats des dosages individuels de la FSH, LH, E2 et leptine se trouvent en annexe 7.

3.1. Dosage de la leptine

Les moyennes de la leptinémie au cours du temps pour les trois groupes sont de 2.32, 2.32, 2.7 ng/ml pour le groupe 'volonté', 2.21, 2.16, 2.83 ng/ml pour le groupe 'restriction' et 2.18, 2.52, 2.84 ng/ml pour le groupe 'flushing'. On observe une évolution de la leptinémie moyenne au cours du temps dans les trois groupes (figure 48). Celle-ci augmente pour tous les groupes. On n'observe pas de différence significative entre les groupes, ni au cours du temps ($P > 0.05$).

On observe aussi une évolution de la leptinémie au cours du temps en fonction de l'état corporel (figure 49). Cela indique que pour chaque gamme d'état corporel, la leptinémie augmente au cours du temps, mais de façon non significative ($P > 0.05$).

La leptinémie varie au cours du temps en fonction du poids vif mesuré à la même date (figures 50 à 52). En début et milieu d'expérience (6 juillet et 14 août), la leptinémie est inversement corrélée avec le poids vif mesuré à la même date ($r = -0.32$ et $r = -0.34$ respectivement). En fin d'expérience, il n'y a pas de lien entre la leptinémie et le poids vif ($r = -0.08$).

La leptinémie varie en fonction du gain de poids final (figure 53). On observe que les brebis qui ont pris du poids à la fin de l'expérience ont une leptinémie qui augmente au cours du temps, tandis que les brebis qui ont perdu du poids ont une leptinémie qui est stationnaire entre les deux premières dates puis augmente en fin d'expérience, mais de façon moindre par rapport aux brebis ayant pris du poids.

Une analyse plus détaillée de cette évolution de la leptinémie pour chaque groupe pris séparément est montrée sur les graphes 54 à 59.

Le gain de poids final varie en fonction de la leptinémie de départ (graphe 54 à 56), mais nous n'avons pas pu mettre en évidence des différences significatives. Dans le groupe 'volonté' (graphe 54), les brebis qui, au final, ont pris peu de poids ont une leptinémie plus élevée au départ que les brebis qui, au final, ont pris beaucoup de poids ($r = -0.19$, $P = 0.16$). Dans le groupe 'restriction' (graphe 55), on observe une corrélation entre le gain de poids final et la leptinémie de départ, mais celle-ci n'est pas significative ($r = 0.42$, $P = 0.13$). Pour le groupe 'flushing' (graphe 56), les brebis qui ont perdu beaucoup de poids ont une leptinémie de départ plus élevée que celles qui ont pris du poids. Cependant, on n'observe pas de corrélation significative entre le gain de poids final et la leptinémie ($r = 0.08$, $P = 0.31$).

La leptinémie mesurée en milieu et fin d'expérience (14 août et 12 septembre) varie en fonction du gain de poids final. Dans le groupe 'volonté', la leptinémie mesurée le 14 août augmente avec le gain de poids final (graphe 57). Il existe une corrélation significative entre ces deux paramètres ($r = 0.52$, $P < 0.05$). Dans le groupe 'restriction' (graphe 58), la leptinémie diminue avec la perte de poids. La variation de poids final est corrélée avec la leptinémie,

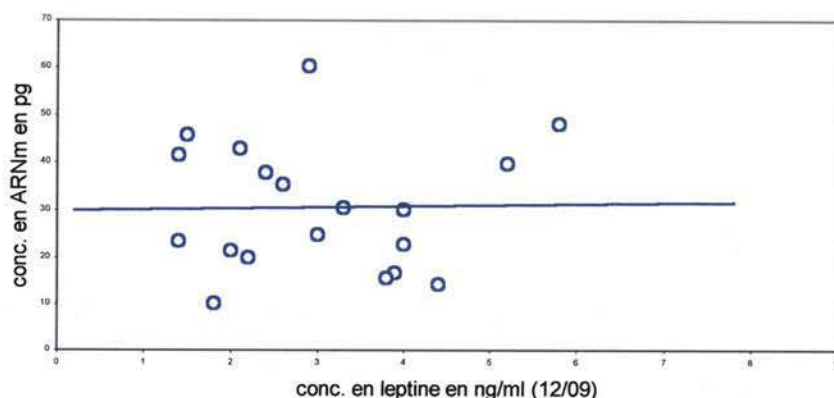


Figure 60 : concentration en ARNm de leptine en fonction de la leptinémie.

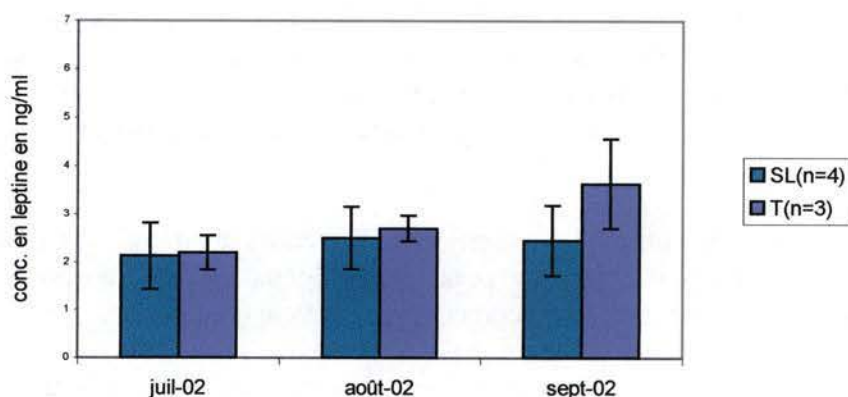


Figure 61 : leptinémie par race pour les brebis qui ont maigri.

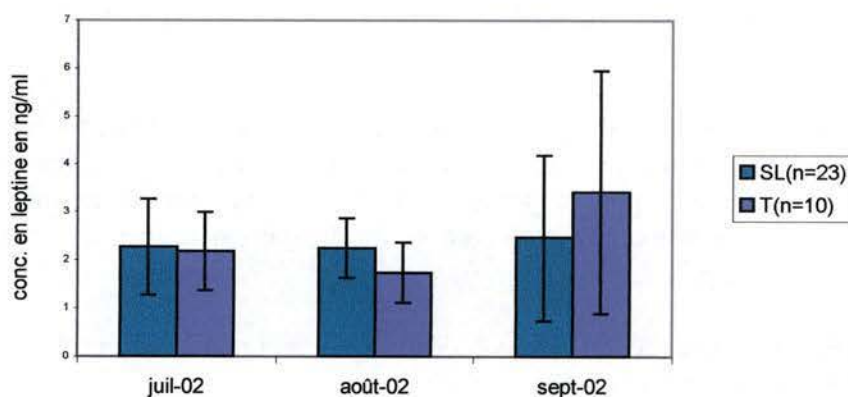


Figure 62 : leptinémie par race pour les brebis qui ont grossi.

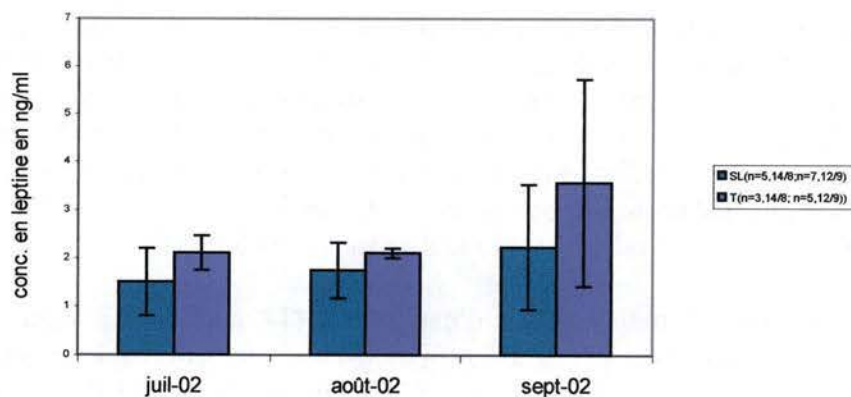


Figure 63 : leptinémie par race pour les brebis du groupe flushing qui ont maigri au cours des deux premiers mois de restriction (juillet et août), puis grossi après le flushing (12 septembre).

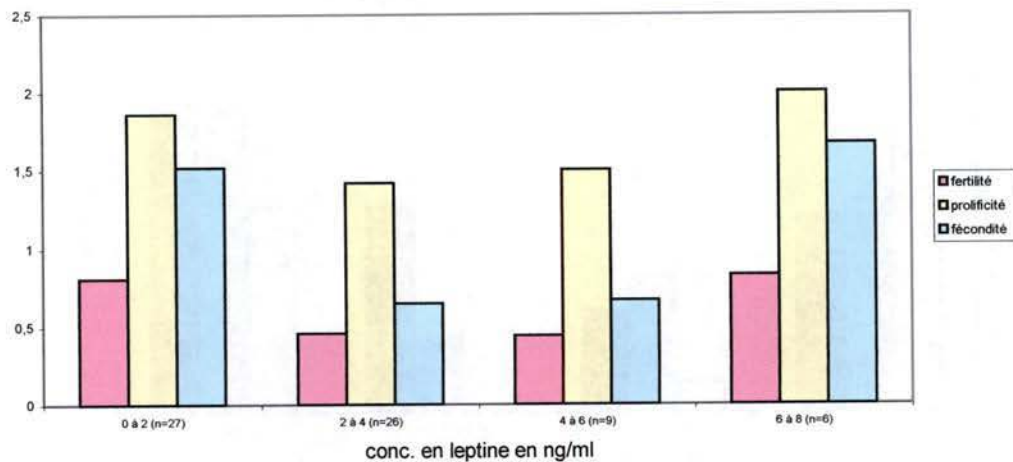


Figure 64 : moyenne des valeurs de fertilité, prolificité et fécondité pour les trois groupes en fonction de la leptinémie.

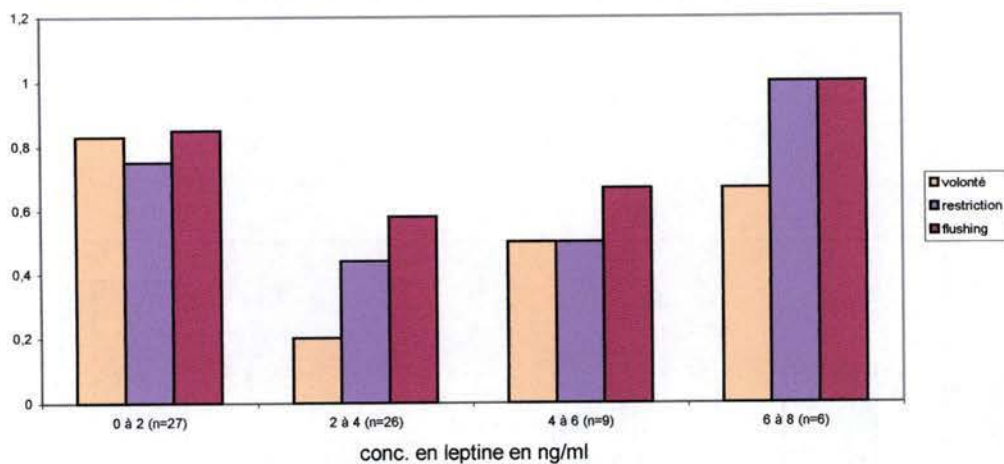


Figure 65 : fertilité dans les différents groupes en fonction de la leptinémie.

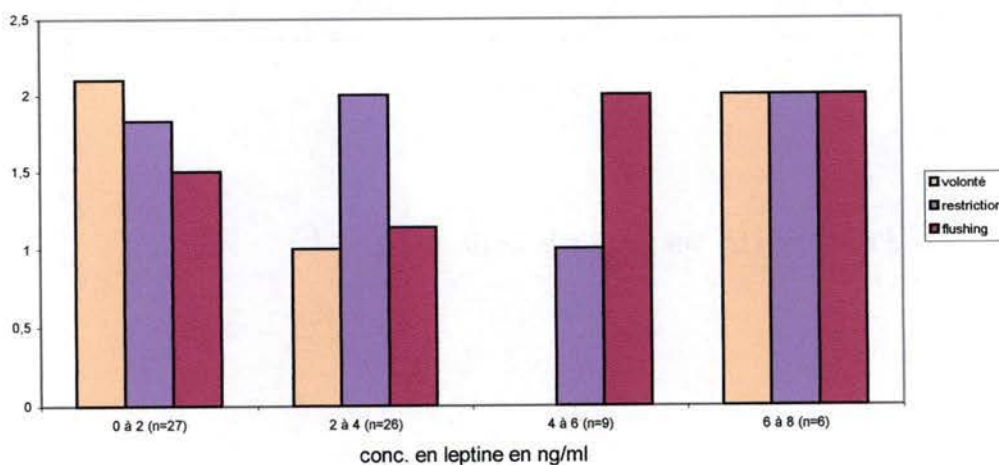


Figure 66 : prolificité dans les différents groupes en fonction de la leptinémie.

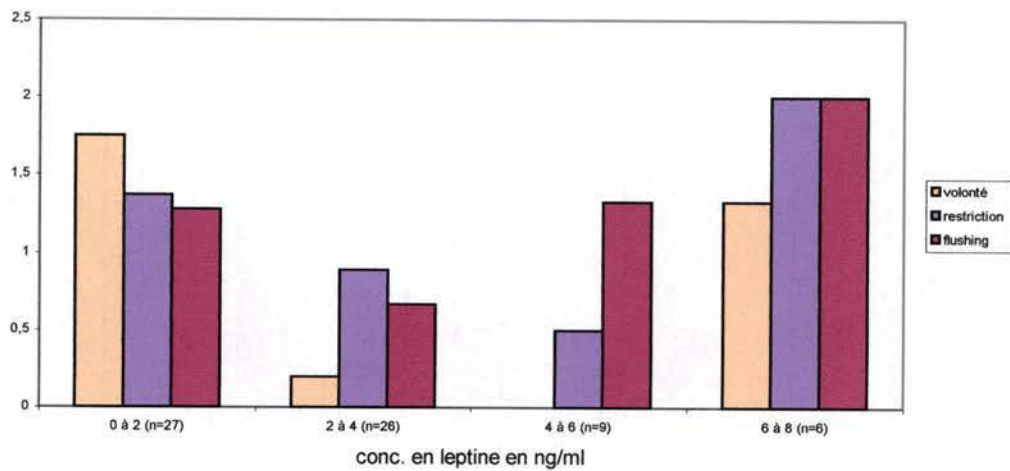


Figure 67 : fécondité dans les différents groupes en fonction de la leptinémie.

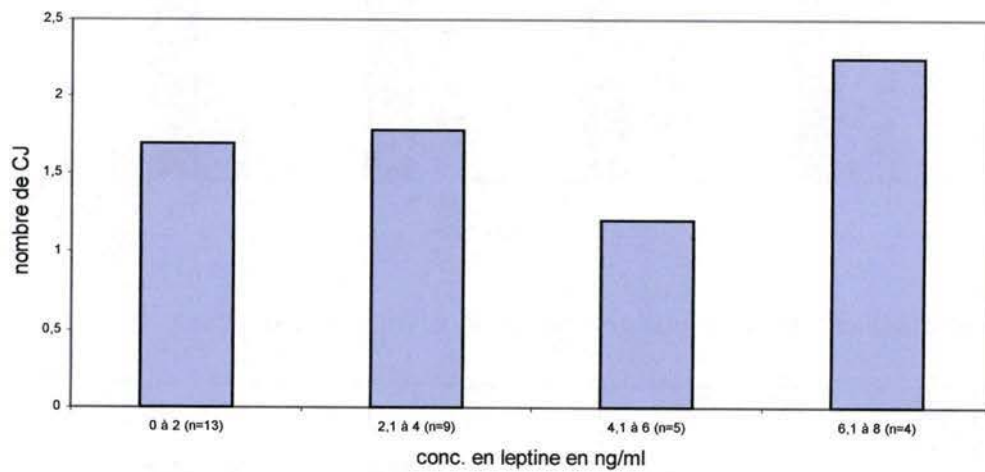


Figure 68 : taux d'ovulation en fonction de la leptinémie.

mais non significativement ($r=0.31$, $P=0.12$). Pour le groupe 'flushing' (figure 59), la leptinémie diminue avec la perte de poids en fin d'expérience.

Il n'existe pas de lien entre la concentration en ARNm de leptine et la leptinémie (graphe 60). La concentration en ARNm n'est donc pas le reflet de la leptinémie.

La leptinémie a été étudiée dans deux races : Suffolk laitier (SL) et Texel (T). Chez les brebis des groupes 'volonté' et 'restriction' qui ont maigri en fin d'expérience, les moyennes de la leptinémie obtenues au cours du temps sont de 0.35, 0.30, 1.76 ng/ml pour la race SL et 0.10, 0.70, 2.0 ng/ml pour la race T (figure 61). Chez les brebis des mêmes groupes qui ont grossi en fin d'expérience, ces moyennes sont de 0.44, 0.32, 2.51 ng/ml pour la race SL et 0.40, 0.36, 1.41 ng/ml pour la race Texel (figure 62). Pour le groupe flushing, les moyennes de la leptinémie au cours de la restriction (7 juillet et 14 août) pour les brebis qui ont perdu du poids sont de 1.50, 1.74 ng/ml pour les brebis SL et 2.10, 2.10 ng/ml pour les brebis T. Dans ce même groupe, les moyennes de la leptinémie pour les brebis soumises au flushing qui ont grossi sont de 2.23 ng/ml pour la race SL et 3.56 ng/ml pour la race T (figure 63). Pour résumé, les brebis des groupes 'volonté' et 'restriction' qui ont maigri entre le début et la fin de l'expérience ont une variation du taux de leptinémie de 0 ng/ml pour les SL et +0.9 ng/ml pour les T. Pour les brebis des mêmes groupes qui ont pris du poids, cette variation est de +0.5 ng/ml pour les SL et +1.5 ng/ml pour les T. Les brebis du groupe 'flushing' qui ont maigri au cours de la restriction ont une variation du taux de leptinémie de +0.2 ng/ml pour les SL et 0 ng/ml pour les T, tandis que celle qui ont grossi au cours du flushing ont un taux qui varie de +0.5 ng/ml pour les SL et +1.3 ng/ml pour les T. L'augmentation de la leptinémie est donc plus forte pour les brebis de race Texel que pour celles de race Suffolk laitier et ce, dans trois cas sur quatre.

La fertilité, la prolificité et la fécondité ont été étudiées en fonction de la leptinémie (figures 64 à 67).

Les brebis des trois groupes qui ont une leptinémie située entre 0 et 2 ng/ml ont une fertilité, une prolificité et une fécondité moyennes de 81%, 1.86 et 152% respectivement. Ces moyennes sont de 46%, 1.42, 65% pour les brebis ayant une leptinémie située entre 2 et 4 ng/ml, de 44%, 1.5, 67% pour les brebis qui ont une leptinémie de 4 à 6 ng/ml et de 83%, 2, 167% pour les brebis ayant une leptinémie de 6 à 8 ng/ml (figure 64).

Si on considère les trois groupes séparément, les moyennes de fertilité pour le groupe 'volonté' sont de 83%, 20%, 50% et 67% pour les brebis ayant une leptinémie de 0 à 2 ng/ml, 2 à 4 ng/ml, 4 à 6 ng/ml et 6 à 8 ng/ml respectivement. Pour le groupe 'restriction', ces moyennes sont de 75%, 44%, 50% et 100% respectivement, tandis que pour le groupe 'flushing', elles sont de 85%, 58%, 67% et 100% respectivement (figure 65). On observe une différence significative de la fertilité entre les brebis ayant une leptinémie de 2 à 4 ng/ml et celles dont la leptinémie est de 6 à 8 ng/ml ($P=0.05$).

Les moyennes de prolificité pour le groupe 'volonté' sont de 2.1, 1.0, 0.0 et 2.0 pour les brebis ayant une leptinémie de 0 à 2 ng/ml, 2 à 4 ng/ml, 4 à 6 ng/ml et 6 à 8 ng/ml respectivement. Pour le groupe 'restriction', ces moyennes sont de 1.83, 2.0, 1.0 et 2.0 respectivement, tandis que pour le groupe 'flushing', elles sont de 1.5, 1.14, 2.0 et 2.0 respectivement (figure 66). On n'observe pas de différence significative entre les trois groupes ($P=0.15$).

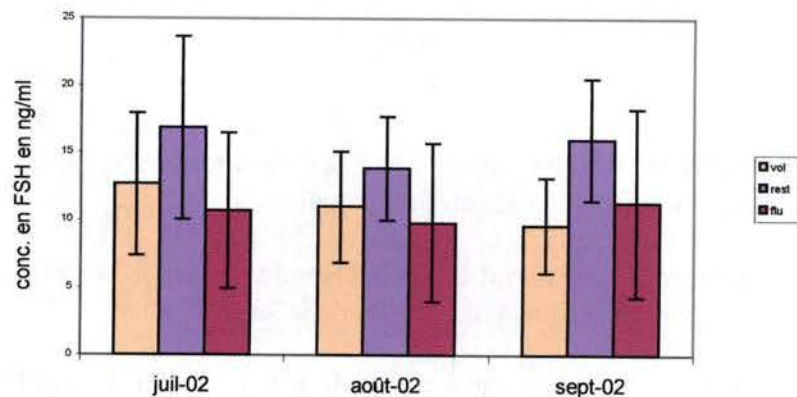


Figure 69 : concentration plasmatique en FSH au cours du temps par groupe.

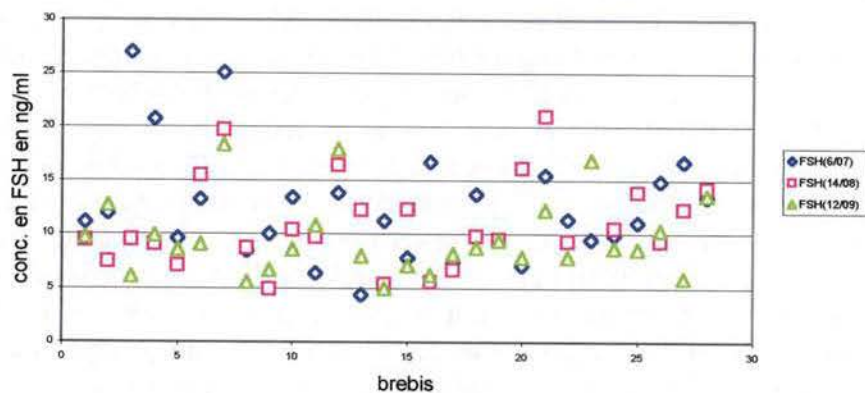


Figure 70 : concentration plasmatique en FSH pour le groupe volenté.

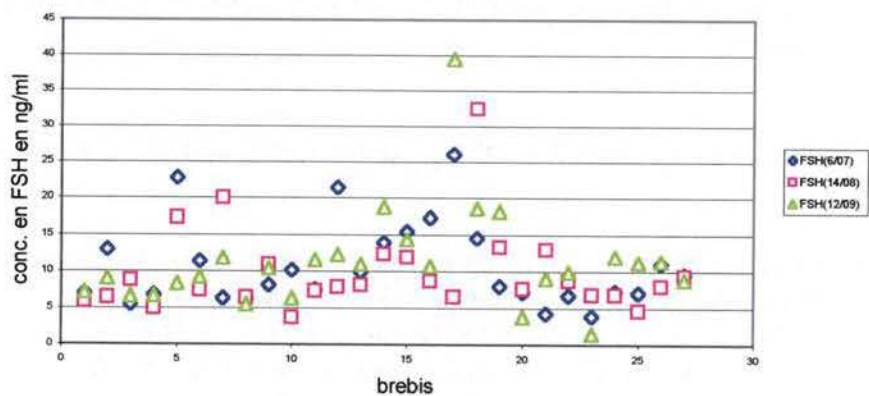


Figure 71 : concentration plasmatique en FSH pour le groupe restriction.

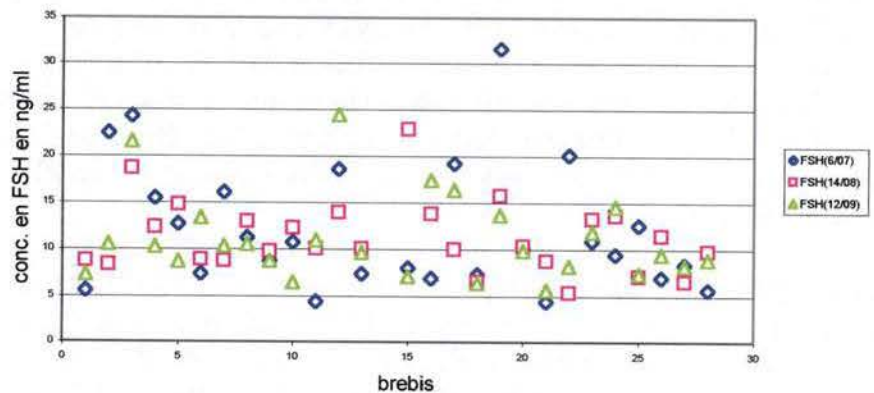


Figure 72 : concentration plasmatique en FSH pour le groupe flushing.

Les moyennes de fécondité pour le groupe 'volonté' sont de 175%, 20%, 0% et 133% pour les brebis ayant une leptinémie de 0 à 2 ng/ml, 2 à 4 ng/ml, 4 à 6 ng/ml et 6 à 8 ng/ml respectivement. Pour le groupe 'restriction', ces moyennes sont de 137%, 89%, 50% et 200% respectivement, tandis que pour le groupe 'flushing', elles sont de 128%, 67%, 133% et 200% respectivement (figure 67). On observe une différence significative entre les trois groupes ($P < 0.05$) et entre les brebis ayant une leptinémie de 0 à 2 ng/ml et celles dont la leptinémie est de 2 à 4 ng/ml, ainsi qu'entre les brebis ayant une leptinémie de 2 à 4 ng/ml et celles dont la leptinémie est de 6 à 8 ng/ml ($P < 0.05$).

Le taux d'ovulation varie avec la leptinémie (figure 68), mais de façon non significative ($P > 0.05$).

3.2. Dosage de la FSH

La brebis Texel N°5700 a été exclue de cette analyse, car sa concentration plasmatique en FSH s'élève à environ 150 ng/ml pour les trois dates. On a aussi observé que cette brebis a eu un taux d'ovulation nul. Elle présente donc probablement une pathologie.

On n'observe pas de différence des concentrations plasmatiques en FSH pour chaque date entre les trois groupes ($P > 0.05$) (figure 69), ni entre les concentrations plasmatiques en FSH au cours du temps pour les groupes 'volonté' (figure 70), 'restriction' (figure 71) et 'flushing' (figure 72) indépendamment. Les moyennes au cours du temps sont de 12.64, 10.96, 9.59 ng/ml pour le groupe 'volonté', 16.83, 13.83, 15.97 ng/ml pour le groupe 'restriction' et 10.67, 9.8, 11.24 ng/ml pour le groupe 'flushing'.

3.3. Dosage de l'E₂

Les données du 14 août obtenues pour les brebis SL N°4417 et 7415 ont été exclues du graphe, car elles sont fortement supérieures à la moyenne et représentent probablement des erreurs de dosage.

On observe une différence hautement significative des concentrations plasmatiques en E₂ pour chaque date entre les trois groupes ($P < 0.05$) (figure 73).

Les moyennes obtenues au cours du temps (figures 74, 75, 76) sont de 22.39, 30.26, 46 pg/ml pour le groupe 'volonté', 100.09, 95.97, 72.99 pg/ml pour le groupe 'restriction' et 82.60, 121.04, 117.33 pg/ml pour le groupe 'flushing' (Il faut noter, la différence d'échelle entre les graphes des figures 74, 75 et 76).

En début et en milieu d'expérience (6 juillet et 14 août), les concentrations plasmatiques en E₂ diffèrent significativement entre les groupes 'volonté' et 'restriction' et 'volonté' et 'flushing' ($P < 0.05$), mais de façon non significative entre les groupes 'restriction' et 'flushing' ($P = 0.18$ et $P = 0.23$ pour les deux dates respectivement).

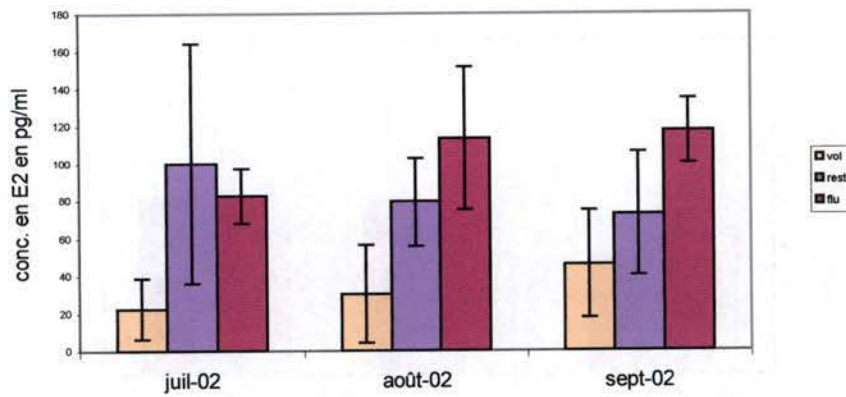


Figure 73 : concentration plasmatique en E2 au cours du temps par groupe.

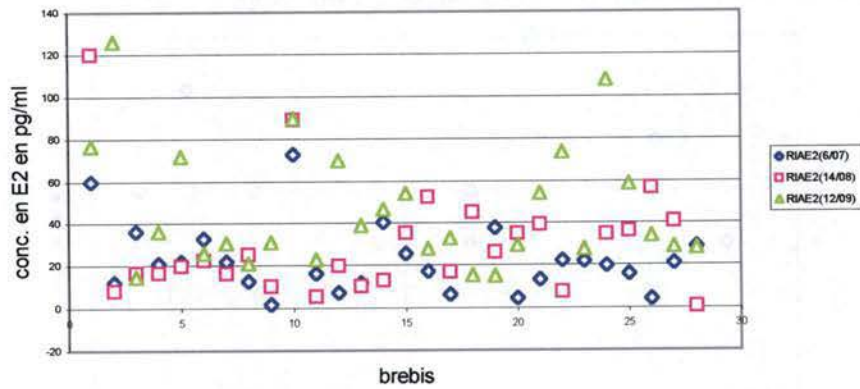


Figure 74 : concentration plasmatique en E₂ pour le groupe volonté.

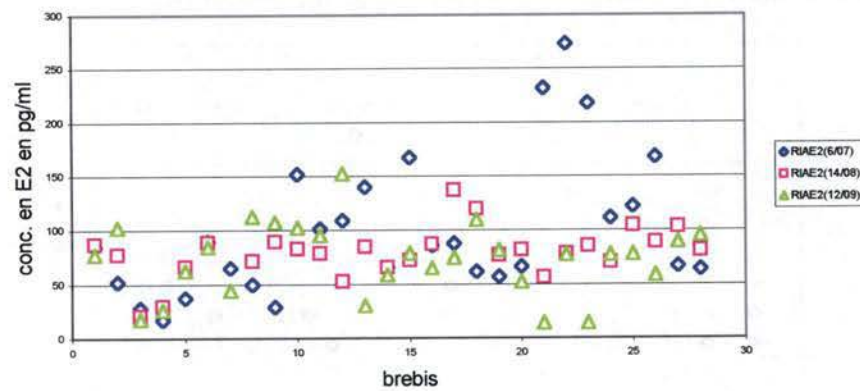


Figure 75 : concentration plasmatique en E₂ pour le groupe restriction.

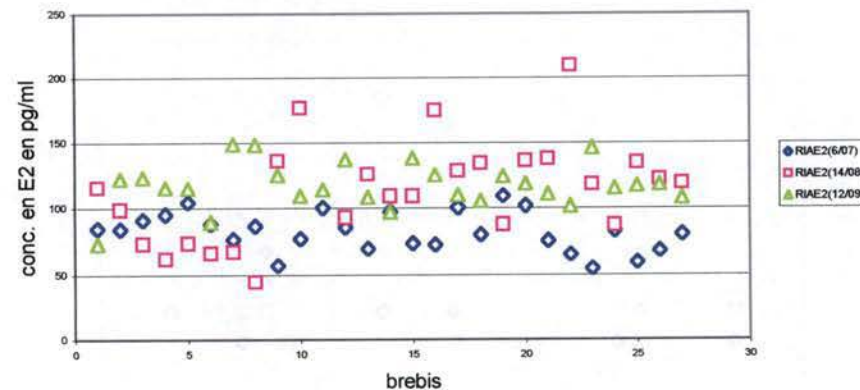


Figure 76 : concentration plasmatique en E₂ pour le groupe flushing.

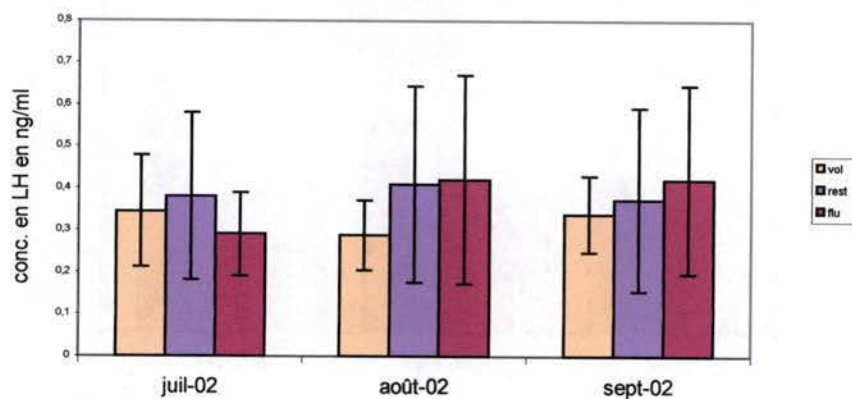


Figure 77 : concentration plasmatique en LH au cours du temps par groupe.

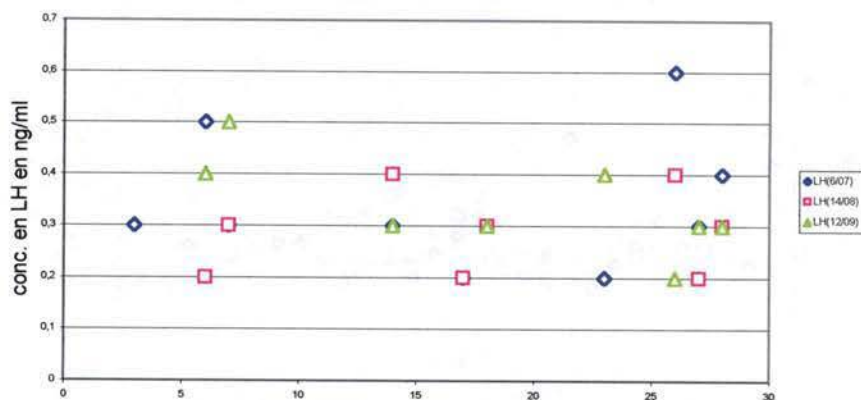


Figure 78 : concentration plasmatique en LH pour le groupe volonté.

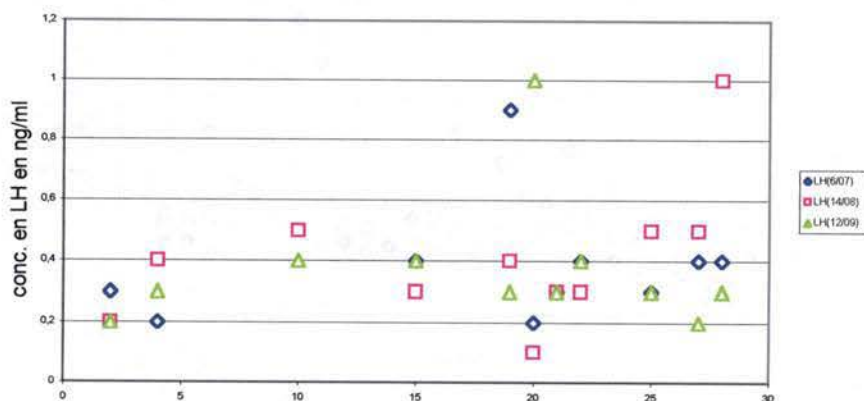


Figure 79 : concentration plasmatique en LH pour le groupe restriction.

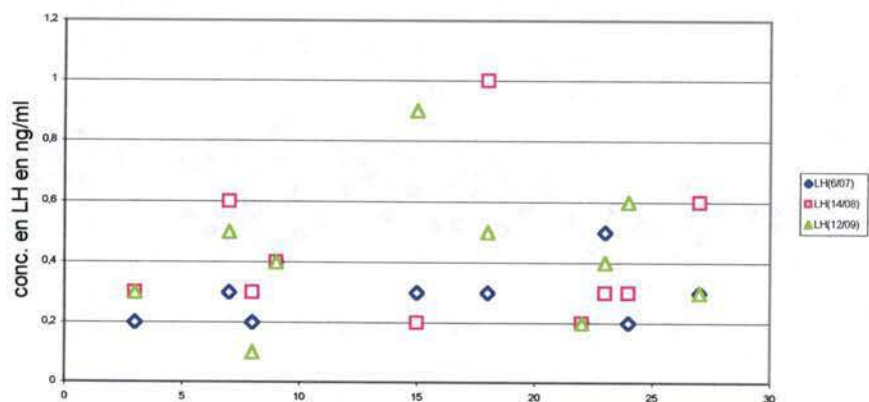


Figure 80 : concentration plasmatique en LH pour le groupe flushing.

En fin d'expérience, les concentrations plasmatiques en E_2 diffèrent significativement entre les groupes 'volonté' et 'restriction', 'restriction' et 'flushing', et 'volonté' et 'flushing' ($P < 0.05$).

3.4. Dosage de la LH

La brebis SL N°4565 a été exclue du graphe, car elle a une concentration plasmatique en LH anormale, typique non pas d'un niveau de base, mais d'un pulse de sécrétion ou d'une décharge préovulatoire.

On n'observe aucune différence en ce qui concerne la concentration plasmatique basale en LH, que ce soit pour une même date entre les trois groupes (figure 77) ou au cours du temps dans un même groupe (figure 78 à 80) ($P > 0.05$).

Les moyennes de la concentration plasmatique en LH au cours du temps sont de 0.34, 0.28, 0.34 ng/ml pour le groupe 'volonté', 0.38, 0.41, 0.37 ng/ml pour le groupe 'restriction' et 0.29, 0.42, 0.42 ng/ml pour le groupe 'flushing'.

3.5. Relation entre les différentes hormones

On n'observe pas de lien entre la concentration plasmatique en FSH et la leptinémie, entre la concentration plasmatique en E_2 et la leptinémie, entre les concentrations plasmatiques en FSH et E_2 , entre les concentrations plasmatiques en E_2 et LH, ni entre la concentration plasmatique en LH et la leptinémie pour chaque date ($P > 0.05$).

Il existe une corrélation significative entre les concentrations plasmatiques en FSH et LH pour chaque date ($r = 0.42$, $P < 0.05$ pour le 6 juillet ; $r = 0.39$, $P < 0.05$ pour le 14 août ; $r = 0.34$, $P = 0.06$ pour le 12 septembre).

Cependant, il faut rester prudent dans l'analyse de ces résultats, car les dosages ont été effectués à partir d'échantillons de sang prélevés à seulement trois dates différentes au cours de l'expérience.

4.Immunohistochimie

Trois types de tissus, tissu adipeux, utérus et ovaires, ont été prélevés sur une ratte (contrôle positif) et une brebis afin de mettre au point une technique d'immunohistochimie ciblant les récepteurs de la leptine chez le mouton.

Les photos ont été prises aux grossissements 40, 100 et 400X. Elles sont classées par types de tissus. Pour chaque tissu, les positifs sont comparés aux négatifs adsorbés et négatifs.

Abréviations reprises dans les photos :

Pour les vaisseaux sanguins : I = intima
 M = média
 A = adventice

Pour l'utérus : LE = endothélium luminal
 SC = stratum cornéum
 SP = stratum spongiosum
 SGE = épithélium glandulaire de surface
 DGE = épithélium glandulaire profond
 MY = myomètre

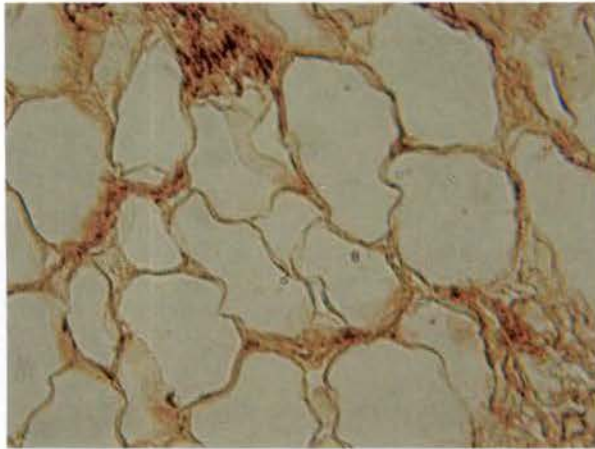
Pour l'ovaire : CJ = corps jaune
 PF = follicule primaire ou primordiale
 SF = follicule secondaire
 TF = follicule tertiaire
 O = oocyte
 G = granulosa
 SM = membrane de Slaviansky
 TI = thèque interne
 TE = thèque externe
 PC = petite cellule lutéale
 GC = grande cellule lutéale

Afin de mieux visualiser les résultats, les commentaires ont été annotés en dessous des photos pour chaque type de tissu. Certaines structures telles que les vaisseaux sanguins ou la vue d'ensemble d'une coupe dans un ovaire ne sont illustrées que pour le rat. Dans le cas des vaisseaux sanguins, on observait le même marquage chez le mouton et le rat, mais la mise au point était plus belle sur la coupe du rat. La folliculogenèse est quant à elle plus développée chez le rat que chez le mouton, c'est pourquoi il était plus intéressant de montrer la vue d'ensemble sur la coupe du rat.

Pour l'ensemble des photos, les positifs présentent un marquage localisé, les négatifs adsorbés ne montrent presque plus de marquage et les négatifs sont quant à eux tout à fait blancs. Ces observations tendent à valider la technique utilisée pour le rat et le mouton puisqu'elles montrent une spécificité du signal.

Tissu adipeux péri-ovarien de rat :

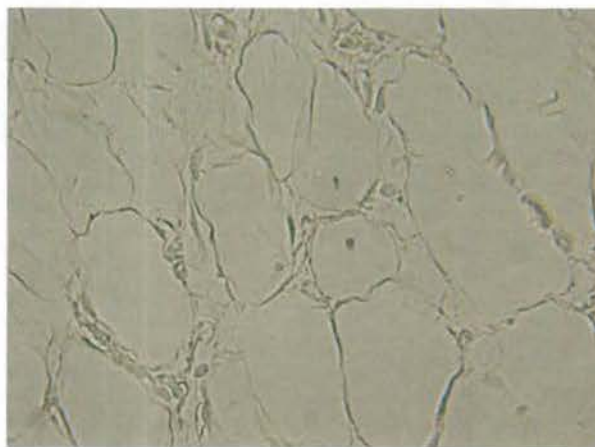
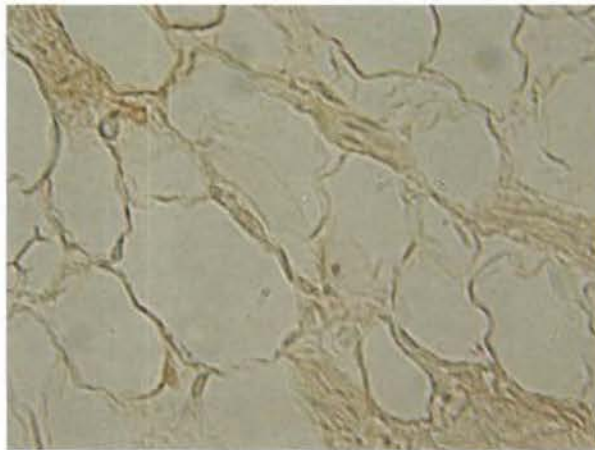
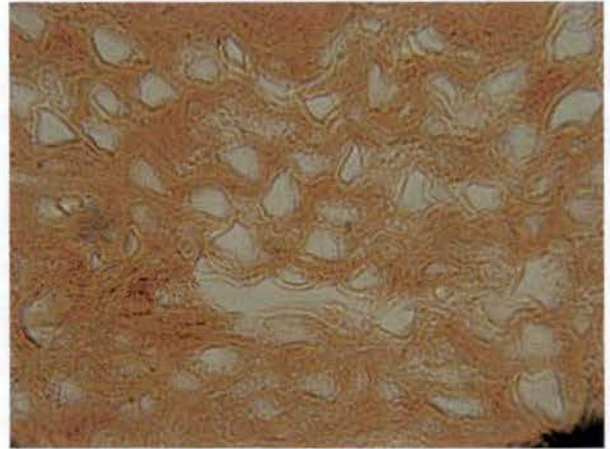
(grossissement 400X)



Tissu adipeux sous-cutané de mouton

prélevé au niveau de la croupe :

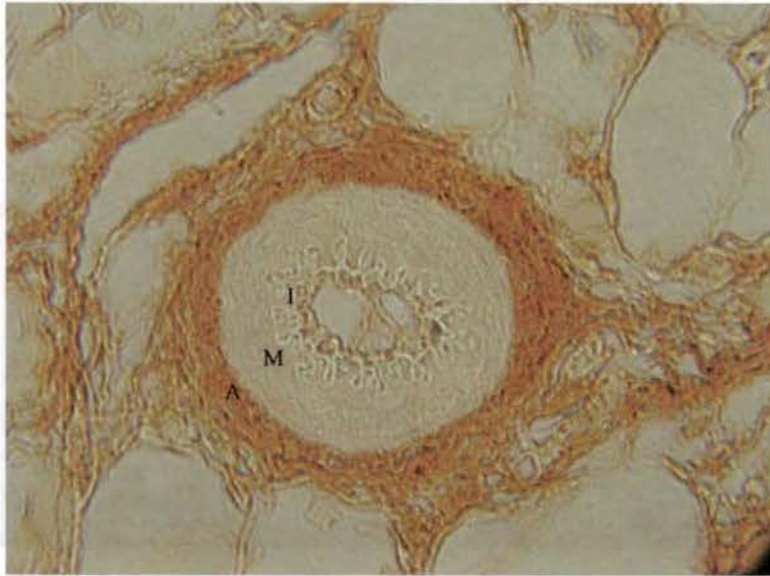
(grossissement 400X)



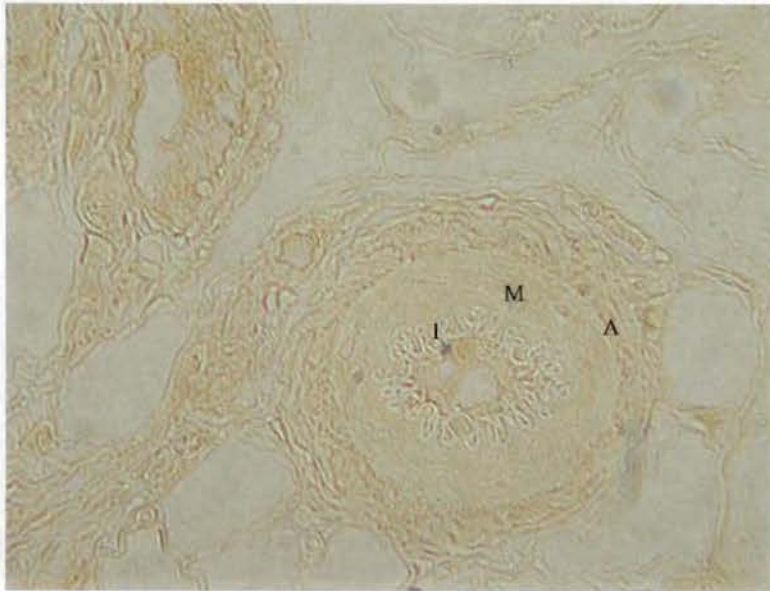
Les adipocytes ne contiennent plus de graisses, car la technique en paraffine utilise des solvants des graisses. Sur la coupe du tissu adipeux de rat, la taille des adipocytes indique que le tissu adipeux contenait beaucoup de graisses. Sur la coupe du tissu adipeux de mouton, les adipocytes peu dilatés indiquent qu'il s'agissait d'un animal maigre. Le tissu contient aussi des adipocytes vides non visibles. On observe que le cytoplasme des adipocytes est marqué.

Vaisseaux sanguins (artériole) situés dans le tissu adipeux au niveau des ovaires de rat :
(grossissement 400X)

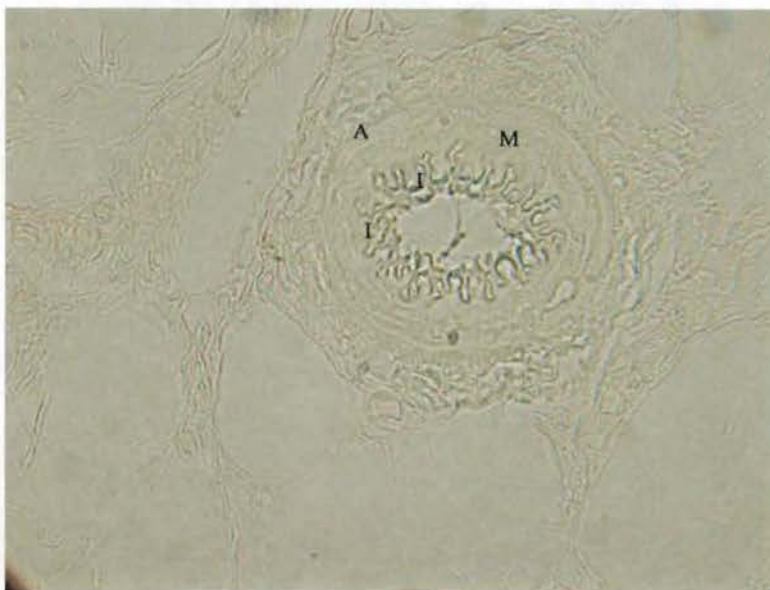
Positif



Négatif adsorbé



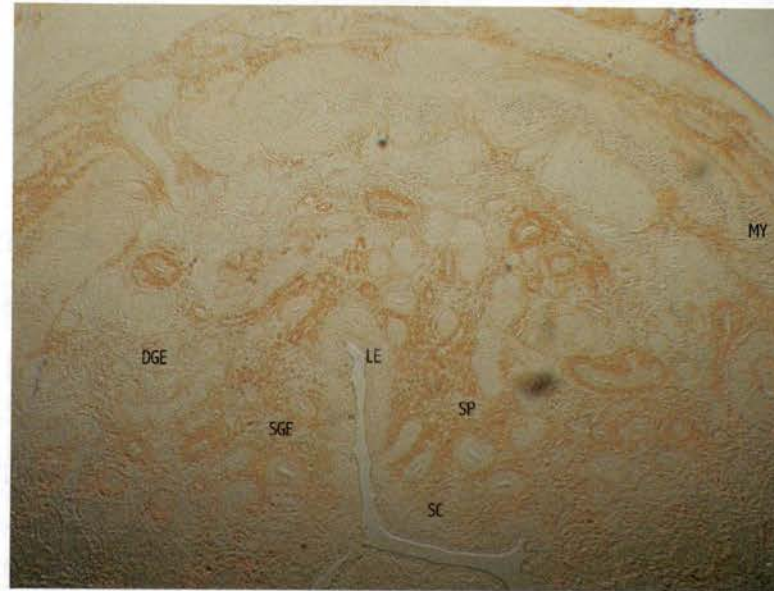
Négatif



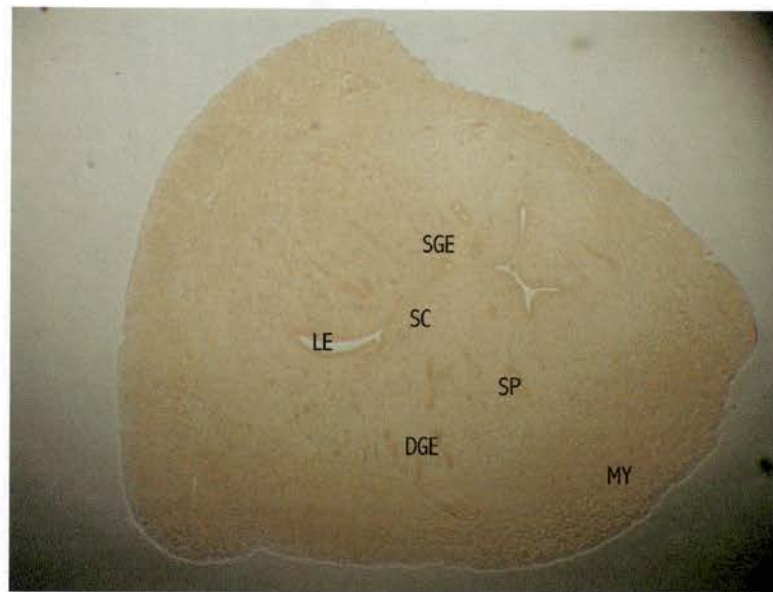
adventice, constituée de tissu conjonctif fibreux, de collagène et de vaisseaux et nerfs, ainsi que le tissu conjonctif ivasculaire sont fortement marqués. L'intima, constituée de l'endothélium et d'une membrane élastique, et la dia, constituée de cellules musculaires et de tissu élastique, ne présentent aucun marquage.

Tissu utérin : prélèvement issu de la partie distale de la corne utérine droite chez le rat :
Vue d'ensemble:

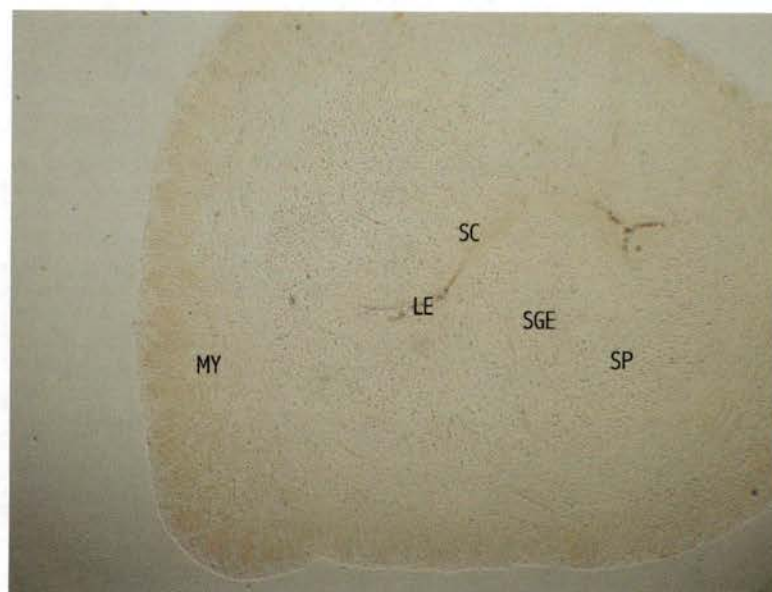
Positif
(grossissement 100X)



Négatif
adsorbé
(grossissement 40X)



Négatif
(grossissement 40X)

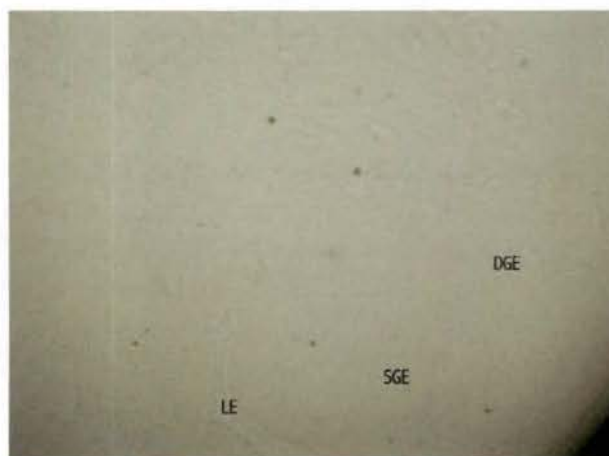
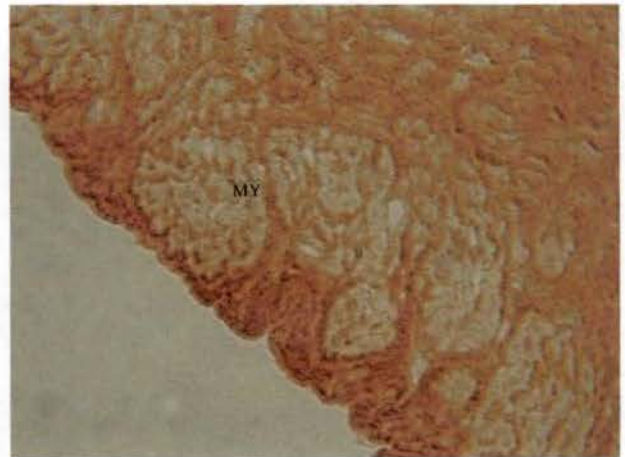
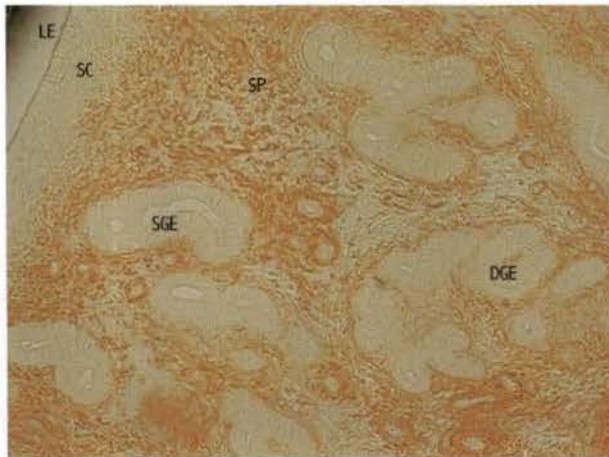


Cette vue d'ensemble permet d'observer les différentes structures présentes sur la coupe telles que l'épithélium luminal, les glandes et le myomètre.

Tissu utérin : prélèvement issu de la partie distale de la corne utérine droite chez le mouton :

Vue de l'épithélium luminal et des glandes :
(grossissement 100X)

Vue du myomètre :
(grossissement 400X)



ositif

Négatif
dsorbé

Négatif

la vue de l'épithélium luminal et des glandes, on observe que la stratum cornéum, constituée de tissu conjonctif se, n'est pas marquée, tandis que la stratum spongiosum, constituée de tissu conjonctif plus lâche est marquée. Le quage est surtout bien visible au niveau du tissu conjonctif périvasculaire.

la vue du myomètre, on observe la présence de signal au niveau des cellules musculaires, mais celle-ci résulte en ie d'un marquage non spécifique, car il est aussi légèrement visible sur la coupe négative. Le tissu conjonctif situé s la couche séreuse et entourant les cellules musculaires est fortement marqué de manière spécifique.

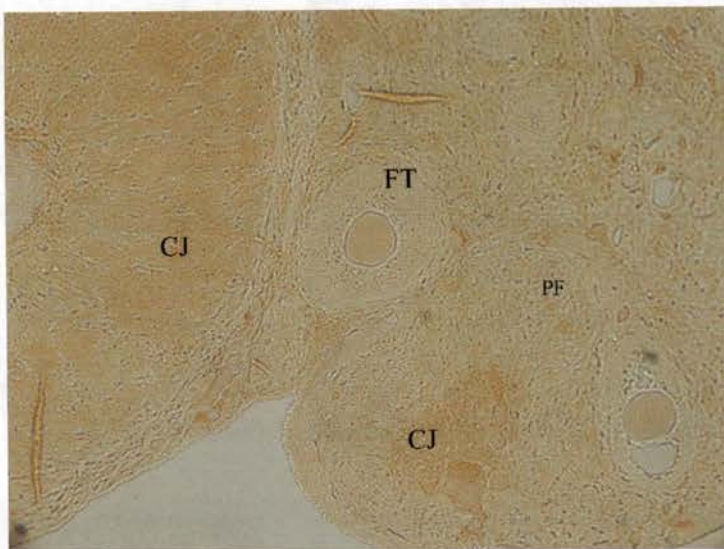
Vue d'ensemble d'une coupe dans un ovaire de rat :

Sur cette même coupe (grossissement 40X), on peut observer des follicules à différents stades.

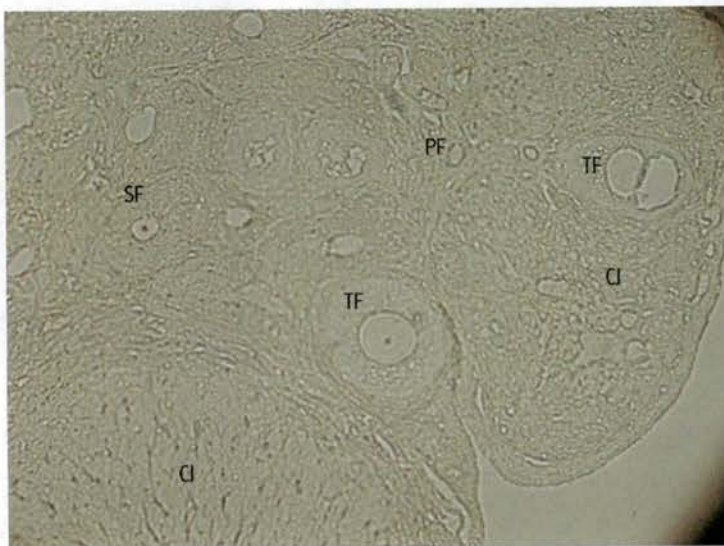
Positif



Négatif adsorbé



Négatif

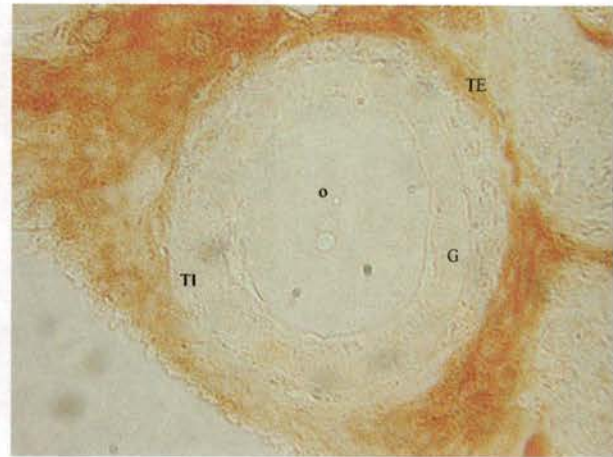
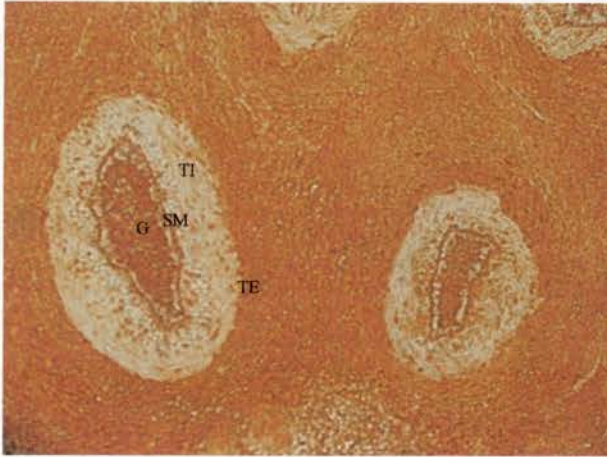


issu conjonctif est marqué et le conjonctif situé juste sous l'épithélium ovarien est fortement marqué. Ce marquage spécifique si on le compare au négatif. Le négatif adsorbé est moins net que sur les autres coupes. Cela indique que la spécificité du marquage est moins grande au niveau des ovaires.

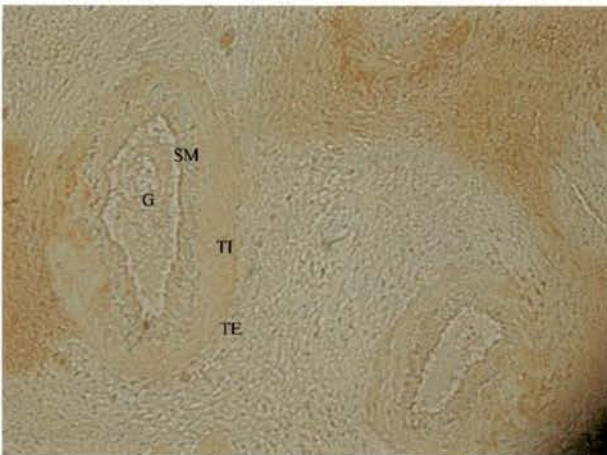
Follicules tertiaires atrétiques
chez le mouton (grossissement 400X) :

Follicules secondaires et primaires ou
primordiaux chez le rat (grossissement 400X) :

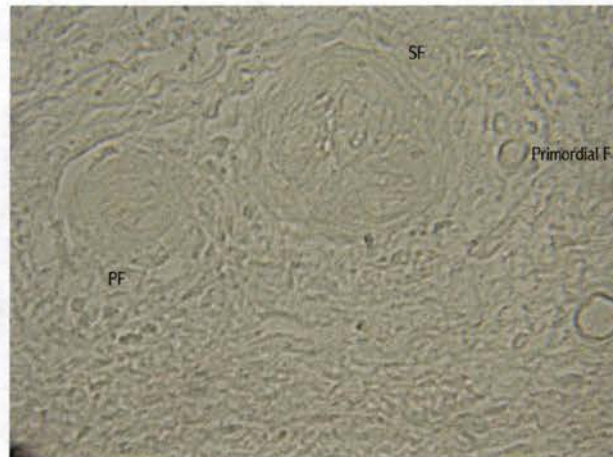
Positif



Négatif
adsorbé



Négatif



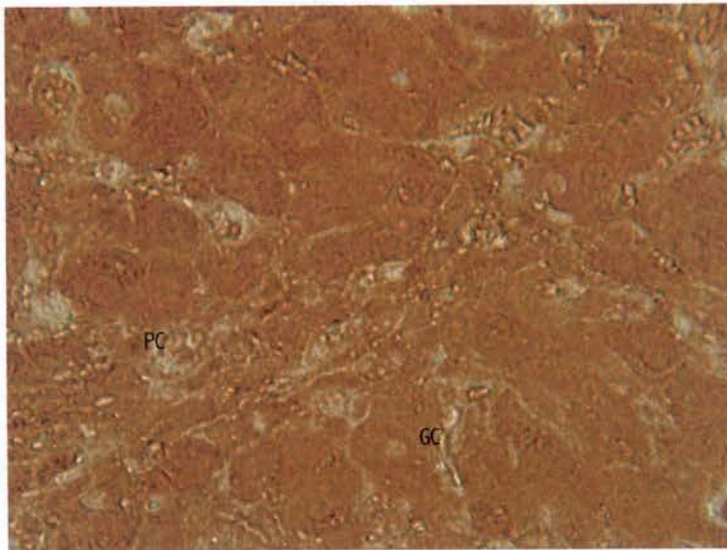
Au niveau des follicules tertiaires atrétiques, l'ovocyte n'est pas visible. La granulosa est fortement marquée. La thèque interne et la thèque externe sont aussi légèrement marquées.

Les follicules atrétiques sont plus marqués que les follicules secondaires, qui, eux, ne présentent du marquage qu'au niveau de la thèque externe.

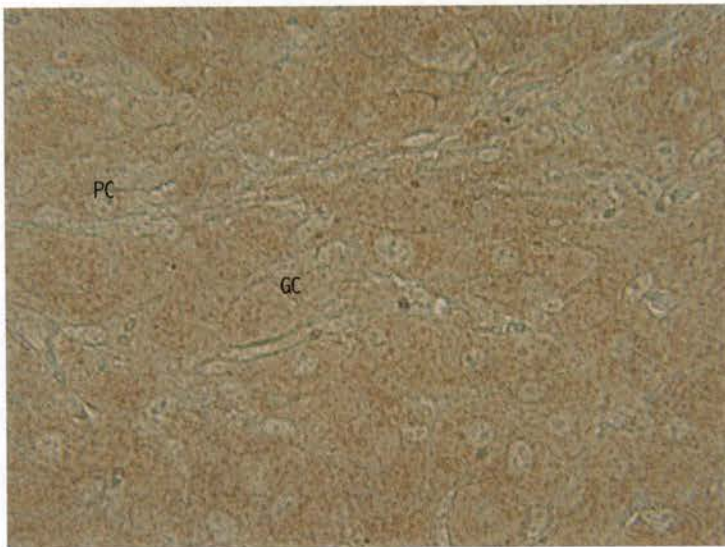
Les follicules primaires et primordiaux sont légèrement marqués, mais difficilement distinguables, car ils sont confondus dans le tissu conjonctif qui présente également un léger marquage.

Corps jaune chez le mouton :
(grossissement 400X)

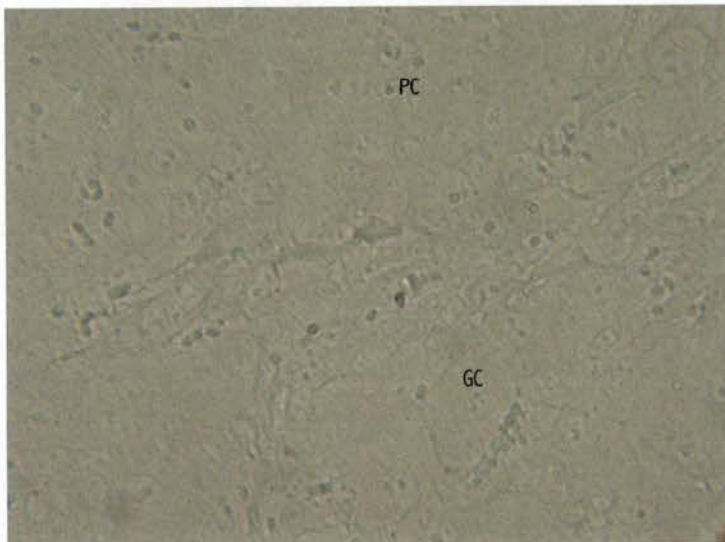
Positif



Négatif
adsorbé



Négatif



cytoplasme des cellules est marqué. On observe aussi que l'intensité du marquage diffère d'une cellule à une autre et, sur une coupe où l'on voit plusieurs corps jaunes, l'intensité varie en fonction des stades de développement des corps jaunes.

Chapitre VI :

Discussion des résultats

1.Objectifs

L'objectif de cette étude était d'aborder deux aspects différents de l'influence du niveau alimentaire sur le système reproducteur de la brebis.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets à court terme de l'alimentation, susceptible de modifier l'état corporel et d'agir sur la fertilité.

Le deuxième aspect concernait la technique de flushing utilisée chez les ovins. Il s'agit d'augmenter le taux d'ovulation et de diminuer le taux de mortalité embryonnaire en donnant un supplément alimentaire pendant une courte période juste avant et après la période de reproduction.

Nous avons donc étudié l'effet du niveau alimentaire et de l'état corporel sur la fertilité de brebis adultes et sur divers paramètres influençant cette fertilité tels que le taux d'ovulation, le taux plasmatique de la leptine et d'autres hormones en relation avec celle-ci, l'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux et la localisation du récepteur à la leptine au sein du tissu adipeux, de l'ovaire et de l'utérus.

Le but de cette étude était avant tout de suivre le plus grand nombre de paramètres susceptibles d'agir sur la reproduction chez le mouton, mais aussi de mettre au point plusieurs techniques utiles à l'analyse de ces paramètres afin de concevoir de nouvelles expériences plus ciblées et réalisées dans des conditions plus adéquates que celles de notre expérience.

2.Méthodes

Pour évaluer l'influence de l'état corporel et du niveau alimentaire sur la fertilité, trois groupes de brebis ont été suivies à l'approche de la saison de reproduction. Le premier groupe était constitué de brebis nourries à volonté, le deuxième de brebis soumises à une restriction alimentaire et le troisième, de brebis ayant subi un flushing après avoir été soumises à une restriction alimentaire pendant deux mois.

L'évolution de ces trois groupes a pu être suivie grâce à des pesées, à l'attribution d'une cote BCS selon la méthode de cotation utilisée pour la race ovine, comme elle est décrite dans l'article de Thompson et Meyer (1994) et des prises de sang effectuées pendant toute la période expérimentale. Les paramètres de reproduction ont pu être étudiés grâce à diverses techniques. Le taux d'ovulation de chaque groupe a été estimé en dénombrant les corps jaunes sur les ovaires d'un ensemble de brebis par la technique d'endoscopie. Les taux plasmatiques de leptine et d'autres hormones en relation avec celle-ci telles que la FSH, la LH et l'oestradiol ont été mesurés par Radio Immuno Assay. Le tissu adipeux a été prélevé par biopsie tissulaire sur un échantillon d'animaux dans les trois groupes afin d'étudier l'expression du gène de la leptine et ce, à l'aide des techniques d'extraction de l'ARN, de RT-PCR semi-quantitative et d'électrophorèse sur gel d'agarose. Une première approche de l'étude immunohistochimique du tissu adipeux, des ovaires et de l'utérus a été réalisée afin de mettre au point une technique visant à déterminer, ultérieurement, la localisation des

récepteurs de la leptine. Pour ce faire, une brebis et une ratte ont été sacrifiées afin de prélever les ovaires, l'utérus et du tissu adipeux.

3. Mise au point d'une technique de RT-PCR quantitative compétitive

Ces techniques sus-citées étant déjà maîtrisées par le laboratoire, celles-ci ont néanmoins dû être adaptées à notre étude. Une technique de RT-PCR quantitative compétitive a quant à elle été mise au point afin d'estimer de façon plus précise cette expression du gène de la leptine. Le contrôle de la quantité d'ARN compétiteur de départ présente un avantage par rapport à la méthode semi-quantitative. De plus, l'utilisation d'un compétiteur homologue, c'est-à-dire créé à partir de la séquence d'ARN cible, constitue un avantage par rapport à l'utilisation d'un compétiteur hétérologue puisqu'elle minimise la différence dans l'efficacité d'amplification. L'ADN compétiteur obtenu par transcription *in vitro* a été séquencé afin de vérifier qu'il s'agissait bien de la séquence attendue. Les résultats obtenus par cette technique ont été analysés grâce à un logiciel d'analyses d'images et ont ensuite été comparés à ceux obtenus par l'analyse semi-quantitative.

La cohérence et la répétabilité des résultats obtenus par la technique compétitive et la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par la méthode semi-quantitative ont permis de valider cette technique.

Cette technique s'est révélée avantageuse dans d'autres études telles que la détection et la quantification d'ARNm de gènes peu exprimés (Vanden Heuvel *et al.*, 1993).

4. Analyses zootechniques

L'étude des différents paramètres zootechniques a permis d'établir des relations entre plusieurs de ces paramètres.

On n'observe pas de variation du poids vif en fonction des groupes et les moyennes de gain de poids mesurées dans chaque groupe sont plus faibles pour le groupe 'flushing' que pour les groupes 'volonté' et 'restriction'. Le flushing n'a donc pas amélioré les gains en poids des brebis. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats. Il est difficile de contrôler la prise alimentaire d'animaux nourris à l'herbe. De plus, il y a une reprise de la croissance de l'herbe au mois de septembre qui correspond à la période où les brebis ont été soumises au flushing. Le coefficient de substitution a pu jouer, car les brebis ont pu manger plus d'avoine que d'herbe. Le flushing a aussi pu être influencé par le stress suite à la modification de la nutrition.

L'indice d'état corporel évolue au cours du temps pour les brebis du groupe 'volonté', tandis que cette évolution est faible pour les brebis des groupes 'restriction' et 'flushing'. Cette absence de corrélation pour le groupe 'flushing' peut s'expliquer par le fait que l'état corporel a été évalué peu de temps après le début du flushing et ne permet donc pas d'observer une modification de l'état corporel. L'état corporel est faiblement corrélé au gain de poids. Il se peut que la technique de cotation ne soit pas représentative lorsque les variations de poids sont trop faibles. De plus, l'estimation de l'état corporel par cette méthode est subjective.

Le taux d'ovulation est corrélé avec le poids vif. On observe une faible corrélation entre le taux d'ovulation et l'état corporel. Par contre, il n'existe pas de relation entre le taux d'ovulation et le gain de poids. Ces résultats sont étonnants, car les techniques d'élevage préconisent le flushing, connu pour faire augmenter le taux d'ovulation. Cependant, les nombreuses études réalisées sur ce sujet par le laboratoire n'ont pu confirmer cette théorie.

Si on tient compte du calcul effectué uniquement à partir des brebis qui ont été inséminées lors du premier cycle détecté par le bélier vaso, la fertilité diffère significativement entre les groupes ($P < 0.05$). Le nombre de brebis concernées est très faible et ne permet pas d'analyser statistiquement la prolificité. La fécondité diffère significativement entre les groupes 'volonté' et 'restriction' et entre les groupes 'restriction' et 'flushing' ($P < 0.05$), mais pas entre les groupes 'volonté' et 'flushing'. Dans ce cas, la technique du flushing apparaît être favorable.

Vu les valeurs faibles obtenues sous cette condition, un second calcul de la fertilité, la prolificité et la fécondité a été effectué en tenant compte des brebis fécondées au cycle suivant par un bélier entier, afin de voir si les résultats varient ou non. Ces brebis étaient encore considérées comme ayant le même état corporel. Cependant, en pratique, les brebis du groupe 'restriction' avaient déjà retrouvé un apport alimentaire normal. Cela peut expliquer la forte augmentation de la fertilité entre la valeur obtenue à partir des brebis inséminées (4%) et celle obtenue à partir des brebis fécondées au cycle suivant rajoutées aux premières (54%).

La prolificité n'est pas corrélée avec le taux d'ovulation. En effet, le taux de mortalité embryonnaire entre dans le calcul de la prolificité et celle-ci a pu être influencée après la fin de l'expérience par l'état nutritionnel et corporel des animaux qui n'étaient plus soumis aux mêmes conditions que celles de l'expérience. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce manque de corrélation. Les brebis, au moment des endoscopies, n'étaient peut-être pas dans le même cycle que celui où elles ont été fécondées. Le dénombrement des corps jaunes a été réalisé sur seulement la moitié des brebis de chaque groupe. Le nombre de brebis pleines après l'insémination était restreint et donnait une valeur de prolificité très faible, c'est pourquoi les brebis saillies naturellement au cycle suivant ont été incluses dans le calcul de la prolificité comme expliqué plus haut. De plus, il a pu y avoir un effet mâle. En effet, il y a des différences de fertilité entre les béliers.

5. Leptine et paramètres zootechniques

Le taux d'expression de l'ARNm de la leptine varie en fonction des groupes. Il est plus élevé pour le groupe 'flushing' que pour le groupe 'volonté' et diminue encore pour le groupe 'restriction'.

Etant donné que les biopsies de tissu adipeux et les prises de sang n'ont pas été effectuées au même moment, aucun lien n'a pu être établi entre le taux d'expression de l'ARNm de la leptine dans le tissu adipeux et la concentration plasmatique en leptine.

Il existe un lien entre le taux d'expression de l'ARNm de la leptine et le taux d'ovulation ($P = 0.15$). Le taux d'expression de l'ARNm n'est pas corrélé avec le poids vif, ni avec le gain de poids et l'état corporel. Cette absence de corrélation est probablement due aux variations de poids limitées. Selon certains auteurs, chez l'ovin, le taux d'ARNm de leptine au niveau du tissu adipeux diminue fortement lors d'une sous-alimentation et augmente lors de la réalimentation (Kumar *et al.*, 1998).

La leptinémie est corrélée avec le poids vif et faiblement avec le gain de poids. On n'observe pas de relation entre la leptinémie et les moyennes d'état corporel au cours du temps.

La leptinémie augmente au cours du temps indépendamment de l'évolution de l'état corporel, du poids vif et du gain de poids. Il existe donc un facteur externe responsable de cette évolution. La photopériode ne peut pas expliquer cette augmentation de la leptinémie puisque la leptinémie diminue en jours courts. Une autre hypothèse pourrait être celle de l'entrée en cycle des brebis. L'effet du cycle sur la leptinémie est encore très contradictoire. Selon certains auteurs, la leptinémie varie en fonction du cycle chez l'homme et augmente pendant la phase lutéale (Ludwig *et al.*, 2000), tandis que d'autres auteurs affirment que, chez le rat, c'est l'expression des récepteurs à la leptine qui varie au cours du cycle, mais pas la leptinémie (Bennett *et al.*, 1999). La nature de l'alimentation a aussi pu influencer l'évolution de la leptinémie puisque les brebis du groupe 'volonté' ont reçu un supplément alimentaire en concentré, les brebis du groupe 'flushing' ont reçu de l'avoine et en septembre, la croissance de l'herbe reprend.

La leptinémie n'est pas corrélée avec le taux d'ovulation.

On observe aussi que l'augmentation de la leptinémie est plus forte pour les brebis de race Texel que pour les brebis de race Suffolk laitier et ce, dans trois cas sur quatre.

6. Leptine et autres hormones reproductrices

La leptinémie n'est pas corrélée avec le taux d'ovulation.

La leptinémie n'est pas corrélée avec les autres hormones mesurées.

On observe une augmentation de la concentration plasmatique en oestradiol. Plusieurs auteurs disent qu'il n'existe pas de corrélation entre l'oestradiol et la leptine (Ludwig *et al.*, 2000). D'autres disent que ces deux hormones sont inversement corrélées puisque l'administration de tamoxifène, un inhibiteur des récepteurs à oestradiol, augmente la leptinémie (Ozet *et al.*, 2001), tandis que certains affirment que l'oestradiol augmente le dépôt de graisse et donc la leptinémie (O'Sullivan *et al.*, 2001).

On observe un lien entre les concentrations plasmatiques en LH et FSH, mais pas entre LH et la leptinémie. Or, la sécrétion de leptine suit la pulsativité de la LH. Cependant, les prises de sang auraient dû être effectuées beaucoup plus régulièrement pour observer cette relation.

Les évolutions des différents paramètres et les comparaisons entre résultats sont limitées. Ceci est dû notamment aux prises de sang qui n'ont pas été effectuées assez fréquemment, ainsi qu'aux variations faibles du poids et de l'état corporel. De plus, le dosage de la leptine, bien que satisfaisant, reste encore à améliorer.

7. Immunohistochimie

Nous avons réussi à mettre en évidence (par immunohistochimie), pour la première fois à notre connaissance, le récepteur de la leptine au niveau des tissus adipeux et reproducteurs chez le mouton. Les résultats coïncident avec la mise en évidence du récepteur par RT-PCR ou hybridation in situ dans d'autres laboratoires.

En effet, nous observons un marquage au niveau du cytoplasme des cellules adipeuses, du tissu conjonctif utérin, de la granulosa, de la thèque externe et interne des follicules et des cellules lutéales.

Nous observons la présence d'un marquage positif au niveau de l'adventice des vaisseaux sanguins. Il est connu que la leptine contribue à l'angiogenèse quand le volume de graisse augmente et qu'elle peut favoriser la croissance des vaisseaux sanguins dans l'œuf en maturation et chez l'embryon précoce (Barinaga, 1998). La présence de ces récepteurs au niveau des vaisseaux sanguins pourrait aussi jouer un rôle de transporteur de la leptine du sang vers les tissus.

Au niveau de l'utérus, le tissu conjonctif entourant les glandes est aussi fortement marqué. La présence de récepteurs à cet endroit pourrait permettre le transport de la leptine vers le fluide utérin qui en contient en grande quantité (Kawamura *et al.*, 2002). Le tissu conjonctif au niveau du myomètre est aussi fortement marqué. Cependant, celui-ci semble moins spécifique que pour les autres tissus.

Au niveau de l'ovaire, les follicules atrétiques sont beaucoup plus marqués que les autres. On sait que la leptine a un effet négatif direct sur la croissance folliculaire et la stéroïdogénèse (Spicer, 2001).

Cependant, il faut être très prudent avant de généraliser la présence de récepteurs à ces endroits, car l'étude consiste en une mise au point de la technique et a été réalisée sur seulement un animal de deux espèces différentes.

*Conclusion
et
perspectives*

Le but principal de ce travail a été d'étudier le rôle de la leptine dans la reproduction chez le mouton. Son expression, sa sécrétion et son récepteur ont été analysés afin de rechercher leur relation avec quelques paramètres reproducteurs.

Pour ce faire, les techniques de dosage R.I.A. et de RT-PCR semi-quantitative déjà utilisées dans le laboratoire ont dû être adaptées à l'étude de la leptine et deux nouvelles techniques ont été mises au point au cours de ce travail. La mise au point d'une technique de RT-PCR quantitative compétitive a fait l'objet d'une grande partie de ce travail. Elle a permis de quantifier l'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux, tandis qu'une première approche immunohistochimique du récepteur à la leptine a permis de localiser celui-ci dans les tissus adipeux et reproducteurs. Les résultats obtenus par ces nouvelles techniques sont plutôt concluants et permettent de valider ces techniques pour l'étude de la leptine chez le mouton.

Nous avons voulu avoir une vue globale sur un maximum de paramètres susceptibles d'influencer la reproduction, afin de préciser les études qu'il serait intéressant de réaliser. Le plan expérimental a donc été établi de façon à pouvoir étudier un maximum de paramètres, c'est pourquoi nous avons dû limiter le nombre et la fréquence des échantillonnages. Les relations obtenues sont très intéressantes et devront être affinées par des expériences plus précises en tenant compte de faire varier plus largement les gains de poids et les états corporels.

Ce travail servira à l'élaboration de nouveaux plans expérimentaux plus ciblés en tenant compte des paramètres qui peuvent interférer avec les conditions imposées aux animaux et à la réalisation des expériences dans les conditions les plus adéquates possibles.

Les techniques mises au point ont pu être validées et pourront être utilisées dans ces prochaines expériences.

Les résultats obtenus ne permettent pas de tirer des conclusions précises, mais ont néanmoins un intérêt considérable, puisque des études plus ciblées sur base de ces résultats pourraient aboutir à de nouvelles découvertes et, à plus long terme, mener à une amélioration de la reproduction chez le mouton. Il serait par exemple intéressant d'étudier l'effet de la leptine sur la reproduction des moutons de race pure et ensuite réaliser une étude comparative avec des brebis issues de croisements.

*Références
bibliographiques*

- AHIMA R.S., FLIER J.S. 2000. *Adipose Tissue as an endocrine Organ*. TEM 11 (8) 327-331.
- AHIMA R.S., SAPER C.B., FLIER S.J., ELMQUIST J.K. 2000. *Leptin Regulation of Neuroendocrine Systems*. Frontiers in Neuroendocrinology 21 (3) 263-307.
- AUWERX J., STAELS B. 1998. *Leptin*. Lancet, 351 (9104) 737-742.
- BARINAGA M. 1998. *Leptin sparks blood vessel growth*. Science 281 1582.
- BENNETT P.A., LINDELL K., WILSON C., CARLSON L.M., ROBINSON I.C. 1999. *Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrus cycle*. Neuroendocrinol. 69 (6) 417-423.
- BLUM W.F. 1997. *Leptin : The voice of the Adipose Tissue*. Horm. Res. 48 (Suppl.4) 2-8.
- BOCQUIER F., BONNET M., FAULCONNIER Y., GUERRE-MILLO M., MARTIN P., CHILLIARD Y. 1998. *Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe*. Reprod. Nutr. Dev. 38 489-498.
- BRADLEY R.L., CLEVELAND K.A., CHEATHAM B. 2001. *The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways*. Rec. Prog. Horm. Res. 56 329-358.
- BRANN D.W., WADE M.F., DHANDAPANI K.M., MAHESH V.B., BUCHANAN C.D. 2002. *Leptin and reproduction*. Steroids 67 95-104.
- BROGAN R.S., MITCHELL S.E., TRAYHURN P., SMITH M.S. 1999. *Suppression of leptin during lactation : contribution of the suckling stimulus versus milk production*. Endocrinology 140 (6) 2621-2627.
- CAPRIO M., FABBRINI E., ISODORI A.M., AVERSA A., FABBRI A. 2001. *Leptin in reproduction*. Trends Endocrinol. Metab. 12 (2) 65-72.
- CHEMINEAU P., BLANC M., CARATY A., BRUNEAU G., MONGET P. 1999. *Sous-nutrition, reproduction et système nerveux central chez les mammifères : rôle de la leptine*. INRA Prod.Anim. 12 (3) 217-223.
- CHILLIARD Y., BOCQUIER F., DELAVAUD C., FAULCONNIER Y., BONNET M., GUERRE-MILLO M., MARTIN P., FERLAY A. 1999. *La leptine chez le ruminant. Facteurs de variation physiologiques et nutritionnels*. INRA Prod.Anim. 12 (3) 225-237.
- CHILLIARD Y., BONNET M., DELAVAUD C., FAULCONNIER Y., LEROUX C., DJIANE J., BOCQUIER F. 2001. *Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration*. Domest. Anim. Endocrinol. 2 271-295.

CLARKE I.J., HENRY B.A. 1999. *Leptin and reproduction*. Rev. Reprod. 4 48-55.

DYER C.J., SIMMONS J.M., MATTERI R.L., KEISLER D.H. 1997a. *Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes*. Domest. Anim. Endocrinol. 14 (2) 119-128.

DYER C.J., SIMMONS J.M., MATTERI R.L., KEISLER D.H. 1997b. *CDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor, and NPY-Y2 receptor*. Domest. Anim. Endocrinol. 14 (5) 295-303.

DYER C.J., SIMMONS J.M., MATTERI R.L., KEISLER D.H. 1997c. *Effects of an intravenous injection of NPY on leptin and NPY-Y1 receptor mRNA expression in ovine adipose tissue*. Domest. Anim. Endocrinol. 14 (5) 325-333.

FAGGIONI R., FEINGOLD K.R., GRUNFELD C. 2001. *Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition*. FASEB J 15 (14) 2565-2571.

FEHMANN H-C., PEISER C., BODE H-P., STAMM M., STAATS P., HEDETOFT C., LANG E.L., GÖKE B. 1997. *Leptin: A Potent Inhibitor of Insulin Secretion*. Peptides 18 (8) 1267-1273.

FRIEDMAN J.M., HALAAS J.L. 1998. *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature 395 763-770.

GARCIA-MAYOR R.V., ANDRADE M.A., RIOS M., LAGE M., DIEGUEZ C., CASANUEVA F.F. 1997. *Serum Leptin Levels in Normal Children : Relationship to Age, Gender, Body Mass Index, Pituitary-Gonadal Hormones, and Pubertal Stage*. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 82 (9) 2849-2855.

GRIFFITHS, MILLER, SUZUKI, LEWONTIN, GELBART 1997. *Introduction à l'analyse génétique*. De Boeck Université 446-448.

HAMIDALLAH N., BISTER J.L., BOULANOUR B., PAQUAY R. 2000. *Nutrition and ram effect on ovarian activity in Sardi ewe lamb*. Proc. Joint ANPA-EAAP-CIHEAM-FAO symposium. EAAP publication (2000) 94 261-263.

HAUGUEL DE MOUZON S., LEPERCQ J. 2001. *Leptine placentaire et pathologies de la grossesse*. Gynecol. Obstet. Fertil. 29 (7-8) 534-537.

HAVEL P.J. 2001. *Peripheral signals conveying metabolic information to the brain : short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis*. Exp. Biol. Med. 226 (11) 963-977.

HOLNESS M.J., MUNNS M.J., SUGDEN M.C. 1999. *Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function*. Mol. Cell. Endocrinol. 157 (1-2) 11-20.

HOUSEKNECHT K.L., PORTOCARRERO C.P., J.S., LEMENAGER R., SPURLOCK M.E. 2000. *Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue : correlation with adipose IGF-1 expression*. J. Endocrinol. 164 51-57.

IQBAL J., POMPOLO S., CONSIDINE R.V., CLARKE I.J. 2000. *Localization of Leptin Receptor-Like Immunoreactivity in the Corticotropes, Somatotropes and Gonadotropes in the Ovine Anterior Pituitary*. *Endocrinology* 4 (141) 1515-1520.

KAWAMURA K., SATO N., FUKUDA J., KODAMA H., KUMAGAI J., TANIKAWA H., NAKAMURA A., TANAKA T. 2002. *Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro*. *Endocrinol.* 143 (5) 1922-1931.

KITAWAKI J., KOSHIBA H., ISHIHARA H., KUSUKI I., TSUKAMOTO K., HONJO H. 2000. *Expression of Leptin Receptor in Human Endometrium and Fluctuation during the Menstrual Cycle*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (5) 1946-1950.

KONFORTOV B.A., LICENCE V.E., MILLER J.R. 1999. *Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon*. *Mammalian genome* 10 1142-1145.

KRISTENSEN K., PEDERSEN S.B., RICHELSEN B. 2000. *Interactions between sex steroid hormones and leptin in women. Studies in vivo and in vitro*. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 24 (11) 1438-1444.

KUMAR B., FRANCIS S.M., SUTTIE J.M., THOMPSON M.P. 1998. *Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheep*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 120 543-548.

LUDWIG M., KLEIN H.H., DIEDRICK K., ORTMANN O. 2000. *Serum leptin concentrations throughout the menstrual cycle*. *Arch. Gyn. Obstet.* 263 (3) 99-101.

LUUKKAA V., SAVONTAUS E., ROURU J., VIRTANEN K.A., BOSS O., HUHTANIEMI I., KOULU M., PESONEN U., HUUPPONEN R. 2001. *Effects of estrous cycle and steroid replacement on the expression of leptin and uncoupling proteins in adipose tissue in the rat*. *Gynecological Endocrinology* 15 (2) 103-112.

MACUT D., MICICACUTE D. 1998. *Leptin and human reproduction*. *Medicinski Pregled* 51 (9-10) 410-414.

MASTRONARDI C.A., WALCZEWSKA A., YU W.H., KARANTH S., PARLOW A.F., McCANN S.M. 2000. *The Possible Role of Prolactin in the Circadian Rhythm of Leptin Secretion in Male Rats, Prolactin and Leptin Release*. *P.S.E.B.M.* 224 152-158.

O'SULLIVAN A.J., MARTIN A., BROWN M.A. 2001. *Efficient fat storage in premenopausal women and in early pregnancy: a role for estrogen*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (10) 4951.

OZET A., ARPACI F., YILMAZ M.I., AYTA H., OZTURK B., KOMURCU S., YAVU A.A., TEZCAN Y., ACIKEL C. 2001. *Effects of tamoxifen on the serum leptin in patients with breast cancer*. *J. Clin. Oncol.* 31 (9) 424-7.

PELLEYMOUNTER M.A., CULLEN M.J., BAKER M.B., HECHT R., WINTERS D., BOONE T., COLLINS F. 1995. *Effects of the obese Gene Product on Body Weight Regulation in ob/ob Mice*. Science 269 540- 543.

SCHUBRING C., PROHASKA F., ENGLARO P., BLUM W., SIEBLER T., KRATZSCH J., KIESS W. 1999. *Leptin concentrations in maternal serum and amniotic fluid during the second trimester: differential relation to fetal gender and maternal morphometry*. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 86 (2) 151-157.

SINHA M.K., OPENTANOVA I., OHANNESIAN J.P., KOLACZYNSKI J.W., HEIMAN M.L., HALE J., BECKER J.W., BOWSER R.R., STEPHENS T.W., CARO J.F. 1996. *Evidence of free and bound leptin in human circulation*. J. Clin. Invest. 98 1277-1282.

SPICER L.J. 2001. *Leptin : a possible metabolic signal affecting reproduction*. Domest. Anim. Endocrinol. 21 251-270.

STEINER R.A., CHEUNG C.C., FINN P., HOHMANN J., CUNNINGHAM M., HOLLOMAN J., KRASNOW S., WYNICK D., CLIFTON D.K. 1999. *Leptin as a molecular motif linking nutrition and fertility*. J. Reprod. Fertil. 23 6.

TAI T-C, LYE S.J., ADAMSON S.L. 1998. *Expression of prostaglandin E2 receptor subtypes in the developing sheep brain stem*. Mol. Brain Res. 57 161-166.

TARTAGLIA L.A., DEMBSKI M., WENG X., DENG N., CULPEPPER J., DEVOS R., RICHARDS G.J., CAMPFIELD L.A., CLARK F.T., DEEDS J., MUIR C., SANKER S., MORIARTY A., MOORE K.J., SMUTKO J.S., MAYS G.G., WOOLFE E.A., MONROE C.A., TEPPER R.I. 1995. *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell. 83 1263-71.

THOMAS L., WALLACE J.M., AITKEN R.P., MERCER J.G., TRAYHURN P., HOGGARD N. 2001. *Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome*. J. Endocrinol. 169 (3) 465-476.

THOMPSON J., MEYER H. 1994. *Body condition scoring of sheep*. <http://eesc.orst.edu/agcomwebfile/edmat/html/ec/ec1433/ec1433.html>.

VANDEN HEUVEL J.P., TYSON F.L., BELL D.A. 1993. *Construction of Recombinant RNA Templates for Use as Internal Standards in Quantitative RT-PCR*. Biotechniques 14 (3) 395-398.

ZACHOW R.J., WEITSMAN S.R., MAGOFFIN D.A. 1999. *Leptin Impairs the Synergistic Stimulation by Transforming Growth Factor-B of Follicle-Stimulating Hormone-Dependent Aromatase Activity and Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Ovarian Granulosa Cells*. Biol. Reprod. 61 1104-1109.

ZHANG Y., PROENCA R., MAFFEI M., BARONE M., LEOPOLD L., FRIEDMAN J.M. 1994. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature 372 425-432.

ZHANG F., BASINSKI M.B., BEALS J.M., BRIGGS S.L., CHURGAY L.M., CLAWSON D.K., DIMARCHI R.D., FURMAN T.C., HALE J.E., HSIUNG H.M., SCHONER B.E., SMITH D.P., ZHANG X.Y., WERY J.P., SCHEVITZ R.W. 1997. *Crystal structure of the obese protein leptin – E 100*. Nature 387 (6629) 206-209.

Annexes

Annexe 1 :

Solutions auto-clavées

Eau

eau désionisée, distillée puis auto-clavée pour préparer les tampons, diluer les réactifs RT-PCR, rincer le matériel.

Eau DEPC

Usage : eau distillée stérile, Rnase-free utilisée pour diluer l'ARN et préparer le tampon MOPS

Préparation : 0,1% DEPC : 1 ml de diéthyl pyrocarbonate + 999 ml d'eau distillée

Incuber une nuit à t° ambiante, puis autoclaver 4 heures.

T10E1

Usage : pour diluer l'ARN, l'ADN, les primers, le tampon colorant, faire les mélanges RT et PCR, diluer les dNTP ...

Composition : - Tris 10mM, pH 8
 - EDTA 0,2mM
 - eau DEPC

Utiliser : - une solution stock de EDTA 20mM : 0,372 g EDTA/50 ml eau DEPC
 - la solution stock de Tris-HCl 100X concentré (1M) (*Sigma*)
 - de l'eau DEPC

Préparation : pour 250 ml : 2,5 ml de solution stock Tris-HCl 1M + 2,5 ml de solution stock EDTA 20mM + 245 ml d'eau DEPC

Autoclaver 2 heures.

T3E0.2

Usage : pour diluer les random primers

Composition : - Tris 3 mM, pH 7
 - EDTA 0,2 mM
 - eau DEPC

Utiliser : - une solution stock de EDTA 20 mM : 0,372 g EDTA/50 ml eau DEPC
 - la solution stock de Tris-HCl 100X concentré (1M) (*Sigma*)
 - de l'eau DEPC

Préparation : pour 100 ml : 300 µl de solution stock Tris-HCl 1M + 1 ml de solution stock EDTA 20 mM + 98,7 ml d'eau DEPC

Autoclaver 2 heures.

Annexe 2 :

Solutions non auto-clavées

Ethanol 75%

Usage : on en utilise 0,5 ml par échantillon à extraire

Préparation : dilution dans de l'eau DEPC à partir d'éthanol 95%

Ethanol 70%

On en utilise 500 µl par échantillon d'ARN à précipiter

Tampon de chargement pour l'ADN 10X concentré

Usage : utilisé pour les électrophorèses en gel d'agarose

Préparation : dans du tampon 10X : - 25% de ficoll 400 *pour faire tomber l'échantillon au fond du puits*
- 0,025% de bleu de bromophénol
- 0,025% de xylène cyanol *2 colorants pour des gammes de masses moléculaires différentes.*

Tampon de chargement pour ARN

Usage : utilisé pour les électrophorèses en gel d'agarose-formaldéhyde

Composition : - 50% glycérol
- 1 mM EDTA
- 0,6% bleu de bromophénol
- 0,6% xylène cyanol

Préparation : pour 1 ml : - 500 µl glycérol
- 10 µl EDTA 10mM
- 100 µl bleu de bromophénol 6%
- 100 µl xylène cyanol 6%

Tampon TAE 1X, pH 8.0

Usage : pour le gel et la phase liquide de l'électrophorèse, prévoir 1 litre.

Préparer une solution stock de TAE 50X avec : - Tris base 242 g
- acide acétique glacial 57.1ml
- 0.5M EDTA (pH 8.0) 100 ml
Porter à 1 litre avec H₂O et ajuster à pH~8.5

Préparation : pour 1 l de TAE 1X : 20 ml de solution stock TAE 50X + 980 ml d'eau distillée

Solution stock de EDTA 0,2M

Usage : pour stopper la réaction de transcription in vitro.

Préparation : à partir de EDTA 372,2 g/mole, dissoudre 0,0744 g dans 1 ml d'eau DEPC

Solution stock de NaCl 1M

Usage : pour préparer le mélange de transcription in vitro.

Préparation : à partir de NaCl 58,44 g/mole, dissoudre 2,922 g dans 50 ml d'eau DEPC.

Solution stock de spermidine 20mM

Usage : pour préparer le mélange de transcription in vitro.

Préparation : à partir de spermidine 99% (*réf. 13274-0010 de ACROS*): 145,25 g/mole,

1. préparer une solution stock de 100mM : diluer 1 g dans 68,84 ml d'eau DEPC, aliquoter en 1 ml et congeler.
2. préparer 10 tubes de solution stock 20 mM avec : 200 µl de solution stock 100mM + 800 µl d'eau DEPC.
3. aliquoter en 10 tubes de 100 µl.

Préparation du Running Buffer

1. préparer du 10X MOPS running buffer avec les composants suivants :

- 200 mM MOPS (acide-free) (*réf. M-3183 de Sigma*) = 41,86 g
- 50 mM acétate de Na (*réf. S-2889 de Sigma*) = 4,1015 g
- 5 mM EDTA-2H₂O (*réf. E-5134 de Sigma*) = 1,861 g

2. mélanger avec 850 ml d'eau DEPC
3. ajuster le pH à 7.0 avec du NaOH 10M
4. ajuster le volume final à 1 litre
5. filtrer à travers un filtre nitrocellulose 2µm (2x)
6. stocker dans le noir

Préparation du PBS 10X

Usage : utilisé pour les rinçage en immunohistochimie.

Composition: Na₂HPO₄ 14.4 g
KH₂PO₄ 2.4 g

Préparation : porter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée.

Préparation du PBS salin 1X

Usage : utilisé pour diluer l'anticorps primaire en immunohistochimie.

Préparation : ajouter : - 0.8 g de NaCl
- 0.02 g de KCl

à 100ml de PBS 1X.

Annexe 3 :

Préparation des réactifs et mélanges congelés

Sondes (Eurogentec)

- 2 amorces utilisées pour la synthèse de l'ARN compétiteur :

COMPET1=5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGGACATCTCACACACA
CGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTTCA-3'

COMPET2 = 5'-TGCGGCAAGGGGCAGCTC-3'

-2 amorces de 18 bases utilisées pour amplifier la leptine :

LEP1= 5'-GACATCTCACACACGCAG-3

LEP2= 5'-GAGGTTCTCCAGGTCATT-3'

(issues de l'article de Yuen et al. (1999))

-2 amorces de 21 bases utilisées pour amplifier la β -actine :

ACTINB1 = 5'-AGACCTTCAACACCCCTGCC-3'

ACTINB2 = 5'-TGCTGGAAGGTGGACAGTGA-3'

(issues de l'article de Tai et al. (1998))

Sous forme lyophilisée (quantité variable) à aliquoter à du 100 μ M dans du T10E1.

Ajouter 10 μ l de T10E1 par nmole d'amorce.

A aliquoter en 50 μ l dans des petits tubes PCR autoclavés

dNTP (Amersham)

Faire un mélange à 25 mM des 4 nucléotides.

Mélanger les 4 solutions de nucléotides (250 μ l chacun à 100mM), on obtient 1ml de mélange à 100 mM

Ajouter 3 ml de T10E1 on obtient 4 ml de mélange à du 25 mM et des nucléotides à du **6.25 mM** chacun.

Aliquoter par 5, 25 et 300 μ l.

Random primers (Gibco)

On veut un mélange à **100 ng/ μ l**

Les RP sont en solution à 3 μ g/ μ l et on a 110 μ l dans le tube.

Diluer 30 fois en ajoutant 3190 μ l de T3E0.2.

Nous obtenons 3300 μ l de solution à aliquoter par 10 μ l ou 50 μ l.

Mélange RT

Disposables

- glace pilée
- tubes PCR 0.2 ml autoclavés

Réactifs et solutions

a) fournis dans le kit :

sont conservés à -20°C , décongeler à t° ambiante juste avant la réaction et recongeler immédiatement.

- reverse transcriptase 10 000 U, 200 U/ μl

dans 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.01% NP-40, 50% glycérol.

- 5x First-strand Buffer(250mM Tris-HCL (pH 8.3 RT), 375mM KCl, 15 mM MgCl_2 .
- 0.1 M DTT

b)Préparation :

mélange RT 1 pour 10 tubes (conserver à -20°)

- 10 μl = 100 ng random primers/tube
- 4 μl 10 mM dNTP Mix(6.25 mM each dATP, dGTP, dCTP et dTTP à pH neutre)
- 106 μl eau distillée stérile

Aliquoter en 12 μl et congeler.

mélange RT 2 pour 10 tubes

- 40 μl 5x buffer
- 20 μl DTT

Aliquoter en 6 μl et congeler.

Mélanges PCR

Réactifs :

- un kit de Taq DNA polymérase (réf. T0303Z de amersham pharmacia biotech) fournit le MgCl₂ et le tampon PCR 10x.

Préparation des mélanges PCR leptine 1 (à l'avance et congeler) :

- Pour 10 ml :
- 50 µl amorce COMPET1 100µM (500 nM au final)
 - 50 µl amorce COMPET2 100µM
 - 320 µl dNTP 25 mM
 - 2 ml tampon PCR (concentré 10X)
 - 7,58 ml T10E1

Aliquoter par 75 µl et 150 µl.

Préparation des mélanges PCR leptine 2 (à l'avance et congeler) :

- Pour 10 ml :
- 50 µl amorce LEP1 100µM (500 nM au final)
 - 50 µl amorce LEP2 100µM
 - 320 µl dNTP 25 mM
 - 2 ml tampon PCR (concentré 10X)
 - 7.58 ml T10E1

Aliquoter par 75 µl et 150 µl.

Préparation des mélanges PCR β-actine (à l'avance et congeler) :

- Pour 10 ml :
- 50 µl amorce ACTINB1 100µM (500 nM au final)
 - 50 µl amorce ACTINB2 100µM (500 nM au final)
 - 320 µl dNTP 25 mM
 - 2 ml tampon PCR (concentré 10X)
 - 7.58 ml T10E1

Aliquoter par 75 µl et 150 µl.

Mélange de transcription in vitro

Réactifs :

- T7 RNA polymérase (20U/ μ l) (réf. R 0884 de Sigma)
- Rnase inhibitor (20U/ μ l) (réf. 27-0816-01 de amersham pharmacia biotech)
- rNTP 100mM chacun (réf. 27-2025-01 de amersham pharmacia biotech)

Préparation du mélange (à l'avance et congeler) :

- Pour 1 ml :
- 40 μ l Tris-HCl 1M, pH 8.0 (40mM au final)
 - 50 μ l solution stock NaCl 1M (50mM au final)
 - 50 μ l DTT 0.1M (5mM au final)
 - 50 μ l Rnase inhibitor (20U/ μ l)
 - 20 μ l rNTP = 4 x 5 μ l chacun (500 μ M chacun au final)
 - 100 μ l solution stock spermidine 20mM (2mM au final)
 - 320 μ l MgCl₂ 25mM (8mM au final)
 - 370 μ l eau DEPC

Aliquoter en 20 μ l et congeler.

Annexe 4 :

Etat corporel et taux d'ovulation

<u>GROUPE 1 :</u> <u>volonté</u>	Poids /Cotation 26-6-1	Poids 6-7-1	Poids /Cotation 14-8-1	Poids 27-8-1	Poids /Cotation 12-9-1	Poids 18-10-1	Gain ou perte de poids (en kg)	Endoscopies Nombre de CJ
SI 2097	81/3	80	77/3	80	81/3		0	
SI 5517	52.5/1	54.5	54.5/1	55	57/1+		+4.5	
SL 0107	67.5/2	67.5	71/2	78	78/3		+10.5	
SL 0114	63/2	66	66.5/1.5		71.5/2+		+8.5	
SL 0117	52/1	54.5	54.5/1	62.5	63/2		+11	
SL 0122	57/3	59.5	57.5/3	60	65/4	70	+13	2
SL 0127	58/2	57	54.5/1	61.5	63/2	69.5	+11.5	3
SL 0179	62/1	62.5	58/1	67.5	67.5/1+		+5.5	
SL 2016	56/1	59	55.5/1.5	63.5	63.5/1+		+7.5	
SL 2018	61/1	65.5	60.5/1	?	69/1+		+8	
SL 2032 ?	82.5/2	83	79/2	82	85/3		+2.5	
SL 2093	46/1	48.5	48.5/1.5	53	55/2	59	+13	
SL 2096	73/2	75.5	72.5/1.5	74	80/2		+7	
SL 4465	72/2	71.5	66/1	71	73/2+		+1	2
SL 5503	63/1	65.5	63/1	66.5	68/2		+5	
SL 5595	64/1	65.5	64/1	71	74/2		+10	
SL 5925	71/1	71	67.5/1	75	76.5/2		+5.5	1
T 0109	53/1	53.5	52.5/1	56.5	56.5/2+		+3.5	1
T 0131	67/2	67	64.5/1.5	67	68.5/2		+1.5	
T 4078	63/3	61.5	60/1.5	64	66.5/3+		+3.5	
T 4107	54/1	55	51/1.5	56.5	56.5/2+		+2.5	
T 5730	47/1	51	49/1	54	56.5/1+		+9.5	
T SN	56/1	58.5	55.5/1	60	62.5/1+		+6.5	2
TI 5550	69.5/3	72	69.5/3	73.5	73.5/4		+4	
TI 5685	63/2	64.5	62.5/1.5	67	67/2+		+4	
TI 7365	72/2	75.5	75/2	80	83/3+		+11	2
TI 7441	59/3	60	57.5/2	62	66/2+	66	+7	2
TI 7443	66/1	69	65.5/1	69	74.5/2+	73.5	+7.5	2

GROUPE 2: restriction	Poids /Cotation 26-6-1	Poids 6-7-1	Poids/ Cotation 14-8-1	Poids/ Cotation 12-9-1	Poids 18-10-1	Gain ou perte de poids (en kg)	Endoscopies Nombre de CJ
SI 5505	69/2	68	72.5/2	72/2		+3	
SL 0103	54/1	58.5	58.5/0.5-1	59/1		+5	2
SL 0116	68.5/1	70	68.5/1.5	69.5/1+		+1	
SL 0119	61/2	66	65/1.5	63.5/2+		+2.5	3
SL 0128	37/1	37.5	42.5/1	43.5/1		+6.5	
SL 2095	60.5/1	60.5	56.5/1	55/1		-5.5	
SL 4417	72/1	70.5	73/1	74.5/1		+2.5	
SL 4469	69/2	73.5	70.5/1.5-2	71/1+		+2	
SL 4476	66/1	66.5	63/1	61.5/1		-4.5	
SL 4565	60/1	60	60.5/1	63/1		+3	2
SL 4567	81.5/2	79	74.5/2	73.5/2		-8	
SL 5618	67/2	68.5	69.5/1	69.5/1		+2.5	
SL 5926	72.5/1	75	72/1	69/1		-3.5	
T 5700	55/1	55.5	59.5/1	50/1		-5	0
T 0105	61/2	62.5	59/2	63/2.5		+2	2
T 0108	53/1	56.5	54/1	53/1		0	
T 0111	64/2	61	63.5/1.5	63.5/2		-0.5	
T 0129	43/2	45	44/1.5	46.5/1+		+3.5	
T 5741	52/1	53	53/1	55/1		+3	1
T 7424	38/1	37	39/1	41/1	42	+4	1
TI 4075	42/1	44.5	47.5/1	49/1		+7	2
TI 4077	49/1	52.5	52/1	54/1		+5	2
TI 5504	67/2	69.5	70.5/1.5	70.5/2+		+3.5	
TI 5512	63/1	65.5	66.5/1	68/1+		+5	
TI 5557	65/2	65.5	64/1.5	63.5/1+		-1.5	2
TI 5561	55/1	56	56/1	56/1+		+1	
tiT 5526	55/1	55.5	58.5/2	54/1		-1	2
TL 7422	44/1	46.5	49/1	49/1	55.5	+1.5	0

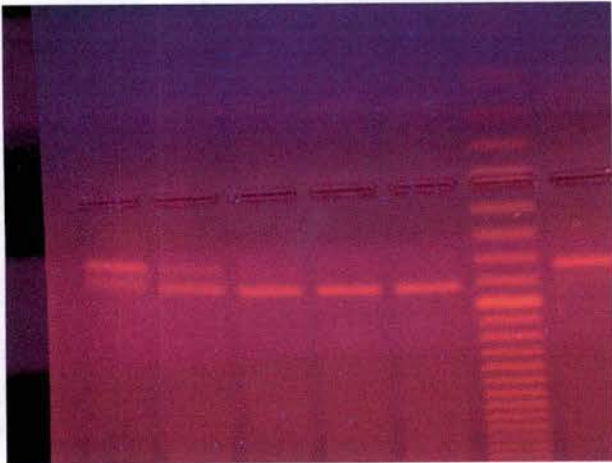
<u>GROUPE 3:</u> <u>restriction-</u> <u>flushing</u>	Poids/ Cotation 26-6-1	Poids 6-7-1	Poids/ Cotation 14-8-1	Gain ou perte de poids (en kg) après restriction	Poids/ Cotation 12-9-1	Poids 18-10-1	Gain ou perte de poids (en kg) après flushing	Endoscopies Nombre de CJ
SI 5546	73/2	72	75/2	+2	75/2		0	
SL 0113	57/1	60.5	57/1	0	58/1		+1	
SL 0118	47/1	50.5	49.5/1	+2.5	48/1		-1.5	1
SL 2098	80/2	76	70/1.5	-10	71/41+		+1	
SL 4419	58/1	57	56.5/1	-1.5	54/1		-2.5	
SL 4474	66/2	66	67.5/2-3	+1.5	67.5/2+		0	
SL 4490	76.5/2	76	76/2	-0.5	76/1+	83	+7	2
SL 5601	61.5/1	62	64.5/1.5	+3	61/1		-3.5	2
SL 5653	80/2	78.5	77.5/1.5	-2.5	73/1	81	+3.5	2
SL 7309	62/1	65	64/1	+2	67/1		+3	
SL 7415	49/1	50	53/1	+4	54.5/1		+1.5	
SL 7421	48/1	48.5	49.5/1	+1.5	49.5/1		0	
T 0101	52/1	50	47/1	-5	50/1+		+3	
T 0126	39/1	43	45/1	+6	45/1		0	
T 0243	42/1	42	46/1.5	+4	47/1	52	+6	2
T 4072	47/1	46	47/1	0	47/1		0	
T 7400=252	39.5/1	42	42.5/1	+3	46/1		+3.5	
T 7442	50/1	50	49.5/1	-0.5	49.5/1		0	2
TI 5502	67/3	66.5	65/2	-2	64/2	56.5	-8.5	
TI 5506	71/2	72.5	72/2	+1	73/1		+1	
TI 5544	64/2	63.5	64.5/2	+0.5	62.5/2		-2	
TI 5555	72.5/2	70	75/2	+2.5	73.5/2.5		-1.5	1
TI 5560	58/1	57	57.5/1	-0.5	58.5/2		+1	2
TI 5736	71/2	76	70/2	-1	67/2		-3	2
TI 7444	70.5/3	70.5	73.5/2.5	+3	73/2+		-0.5	
TI 7462	56/1	56.5	56.5/1	+0.5	55.5/1		-1	
TL 7404	46/1	47	49/1	+3	49/1	52	+3	1

Annexe 5 :

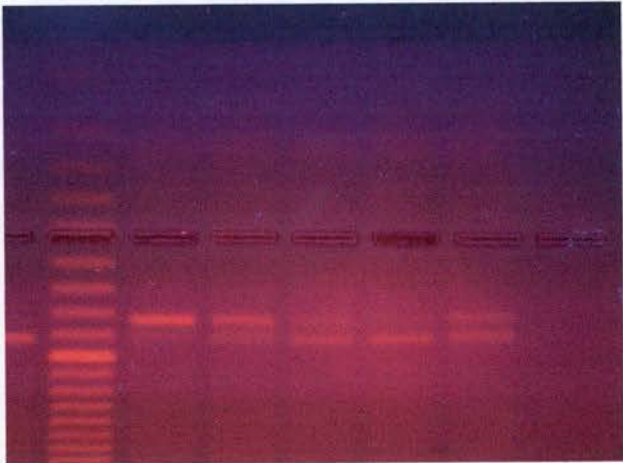
Photographies numériques des PCR compétitives

Groupe 1 : Volonté

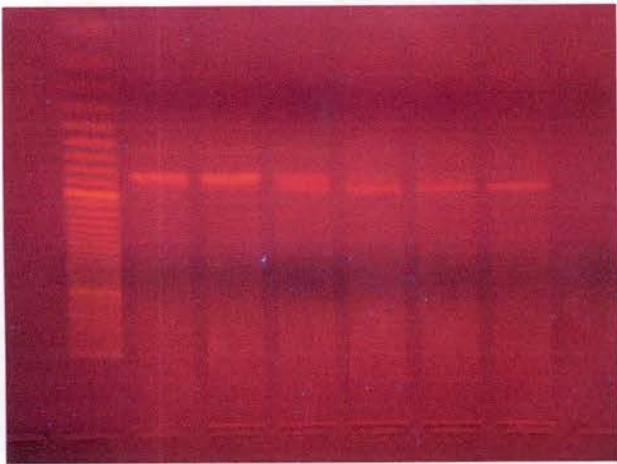
109



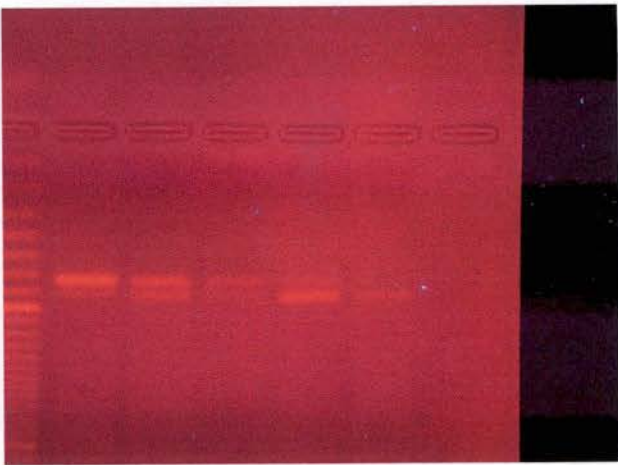
2018



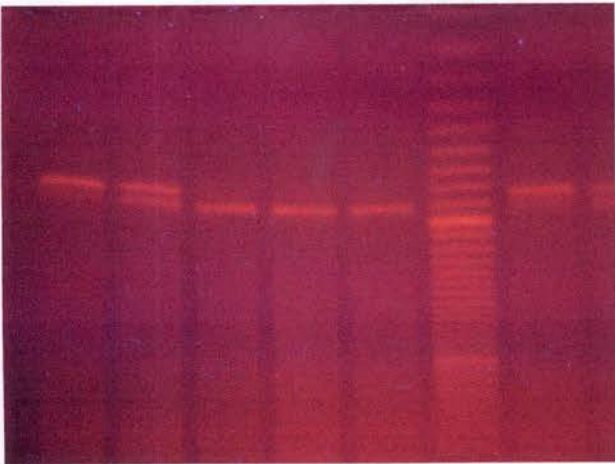
179



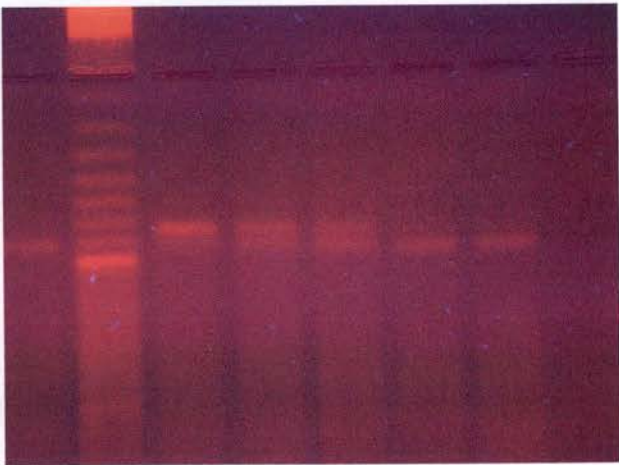
TSN



2096

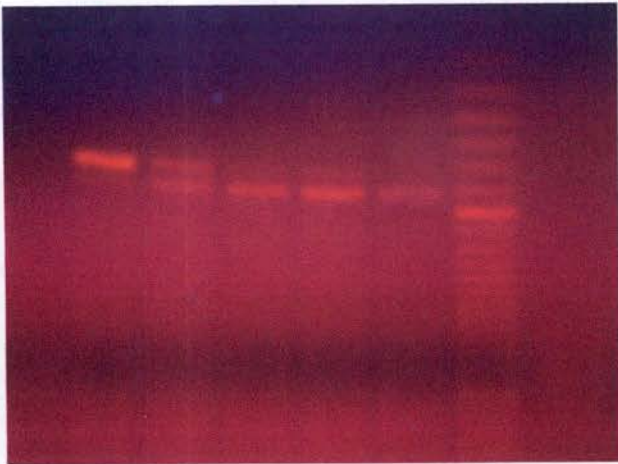


2016

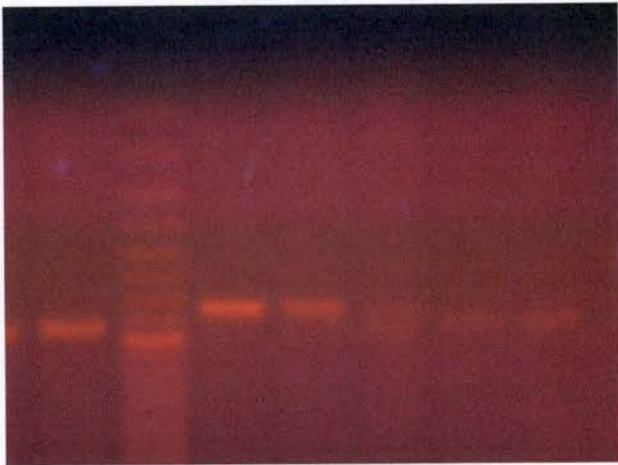


Groupe 2 : Restriction

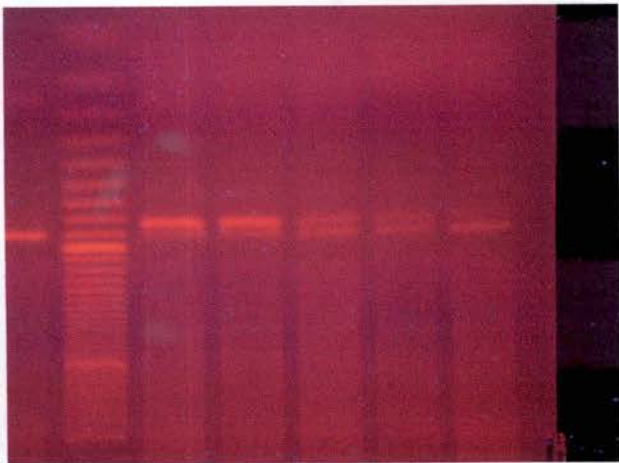
7422



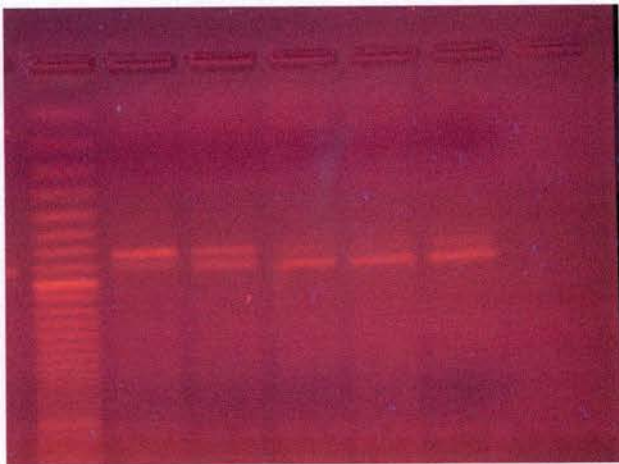
5700



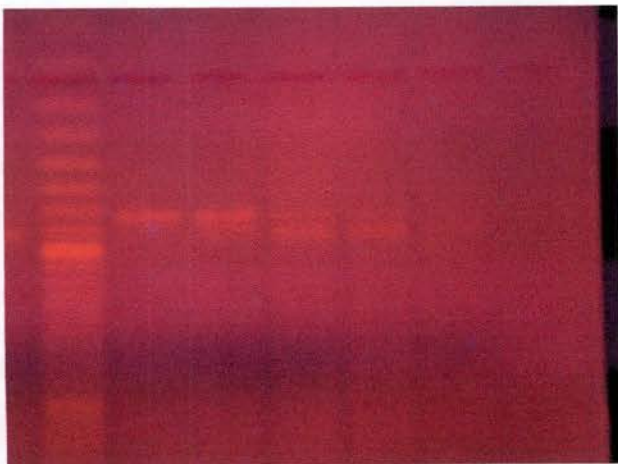
0111



4469

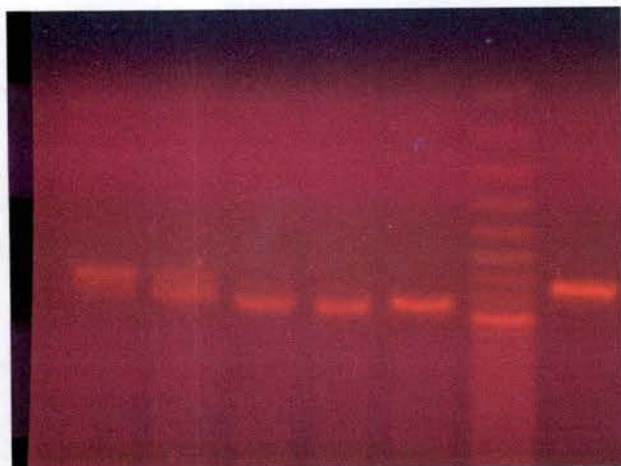


4567

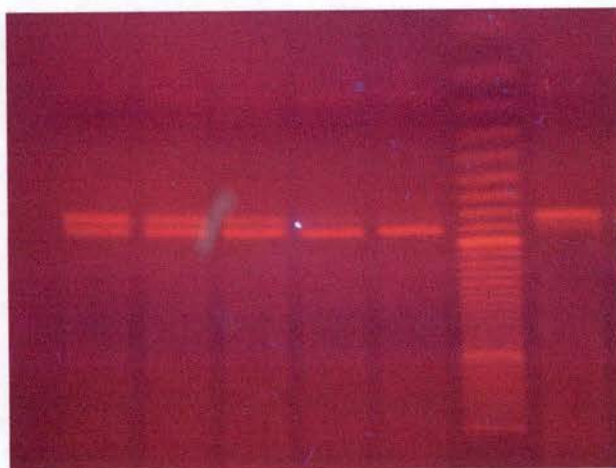


Groupe 3 : Restriction-flushing

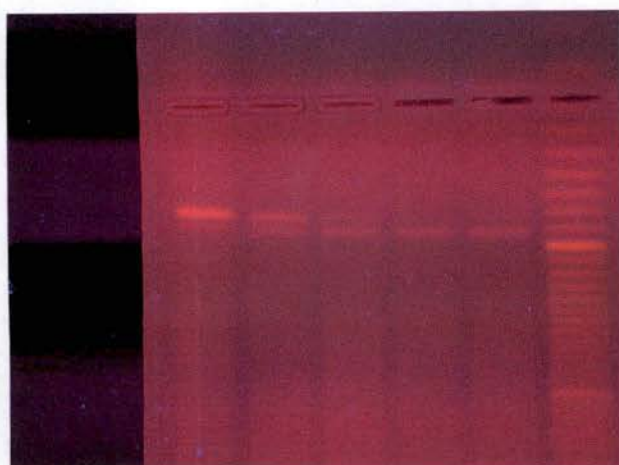
5560



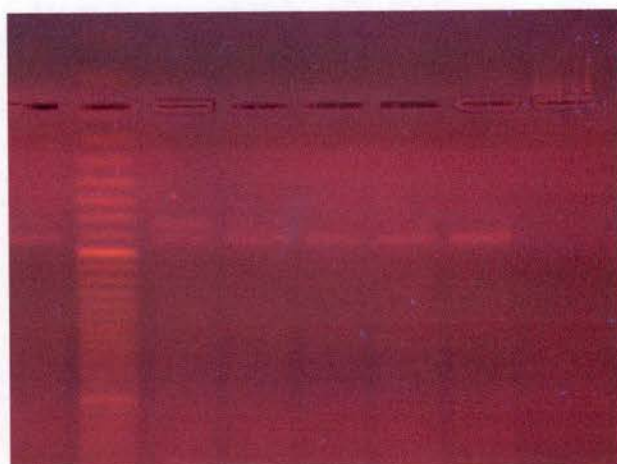
7444



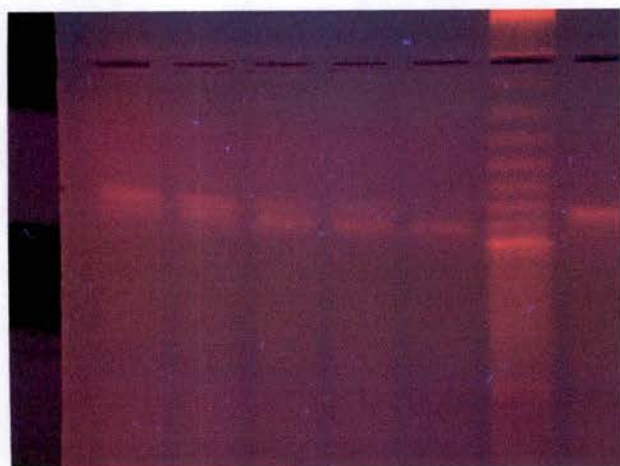
5601



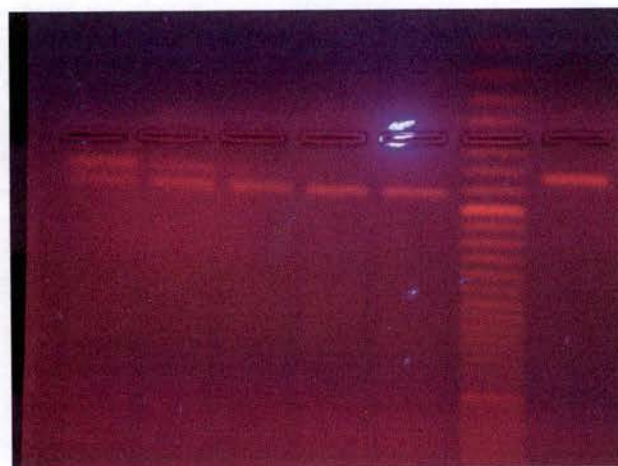
4490



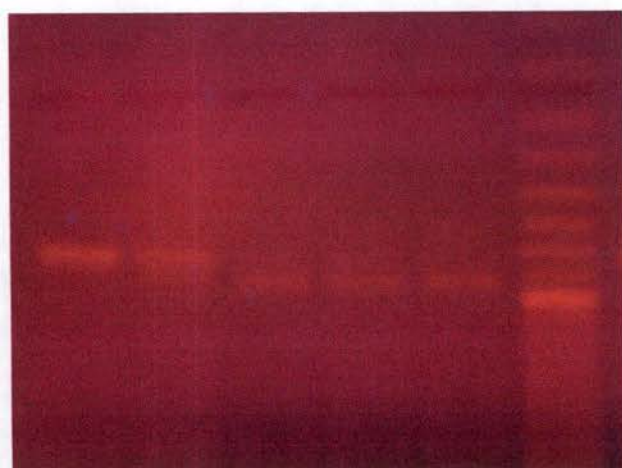
5555



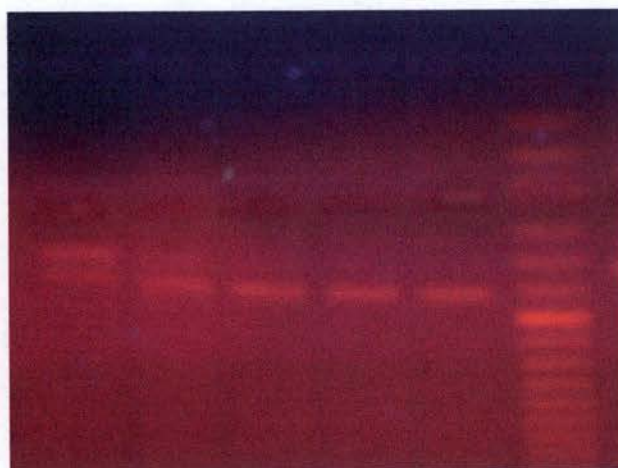
113



5506



7309

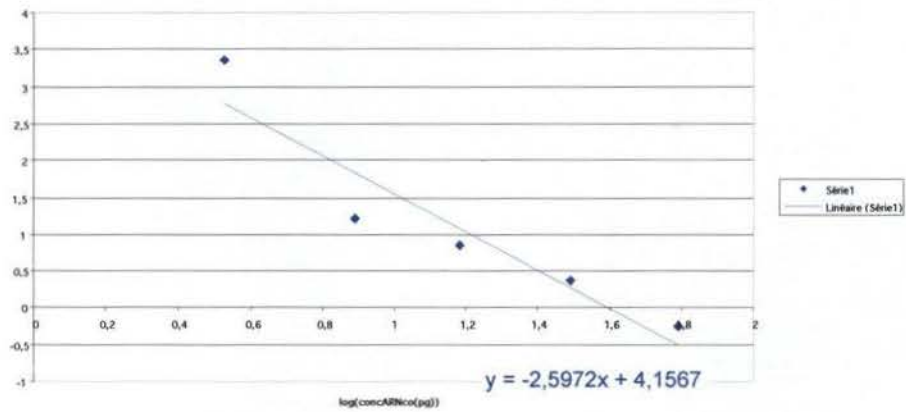


Annexe 6:

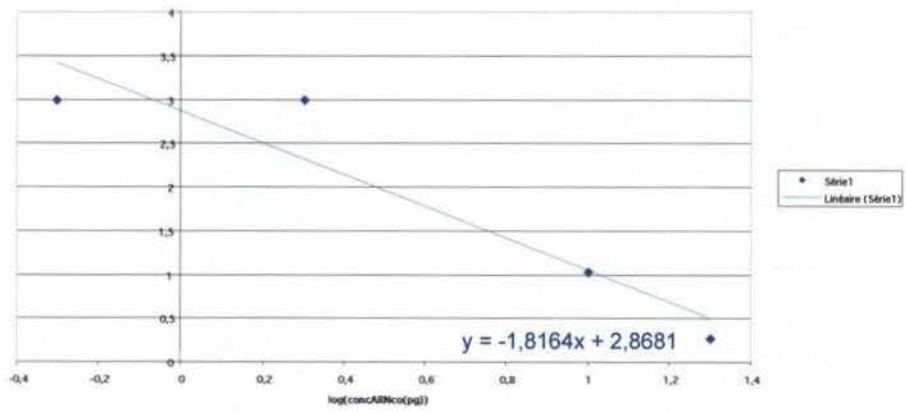
Analyse graphique des PCR compétitives

Groupe 1 : Volonté

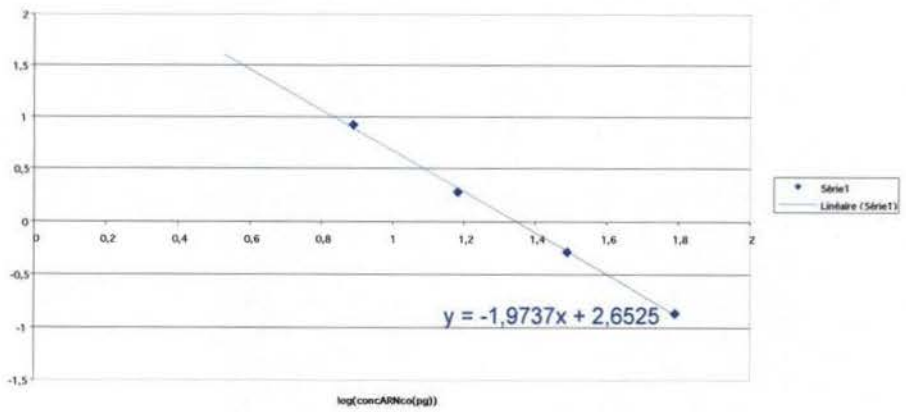
109



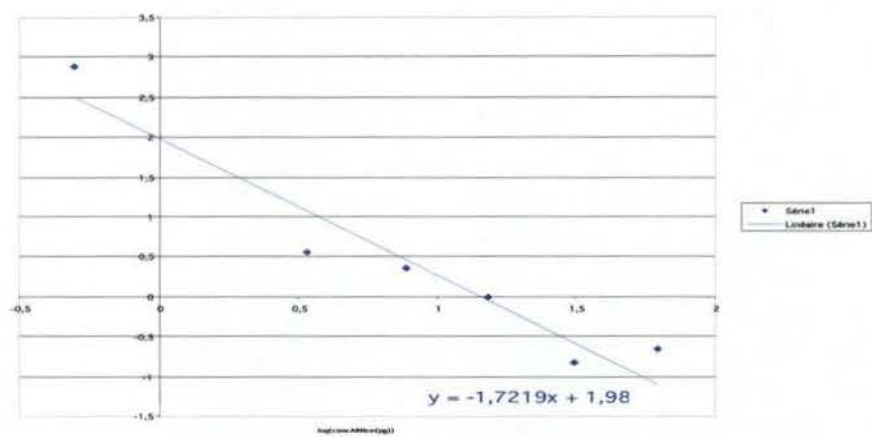
2018



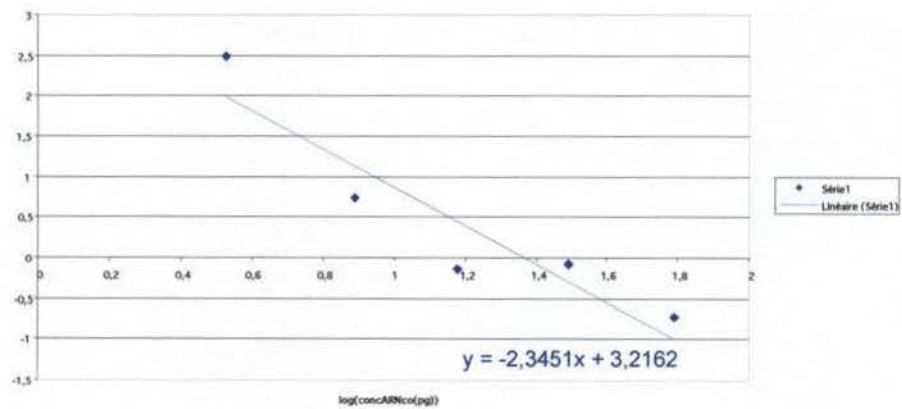
2032



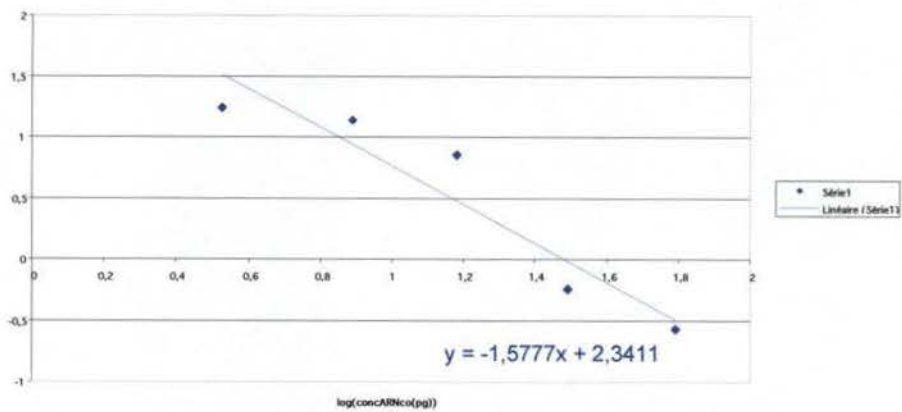
179



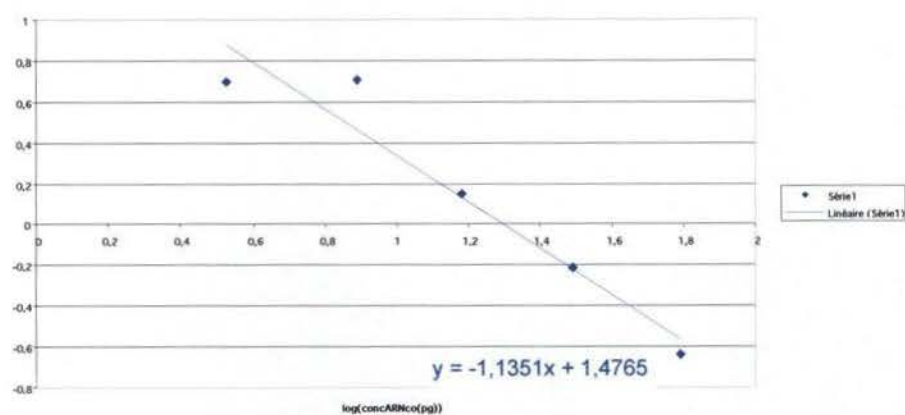
TSN



2096

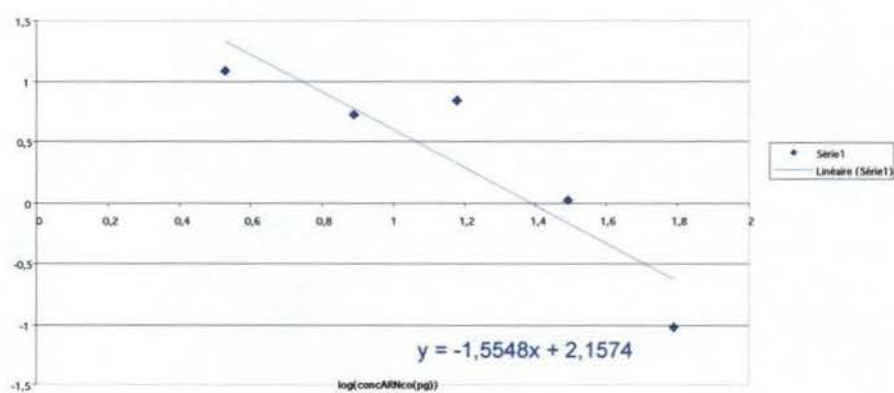


2016

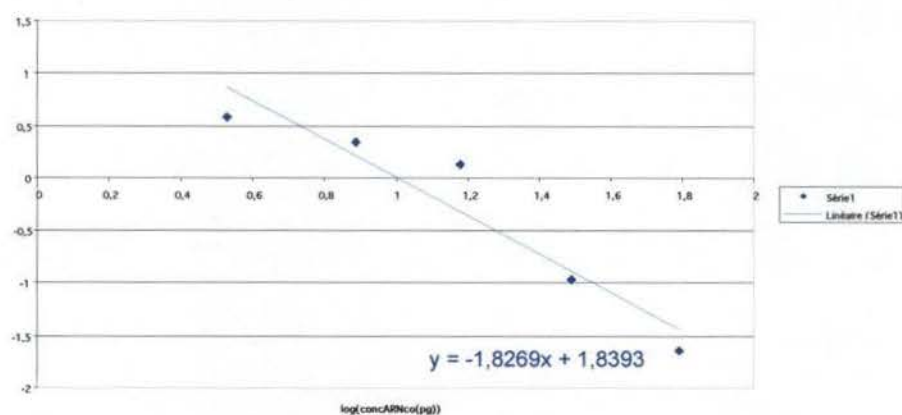


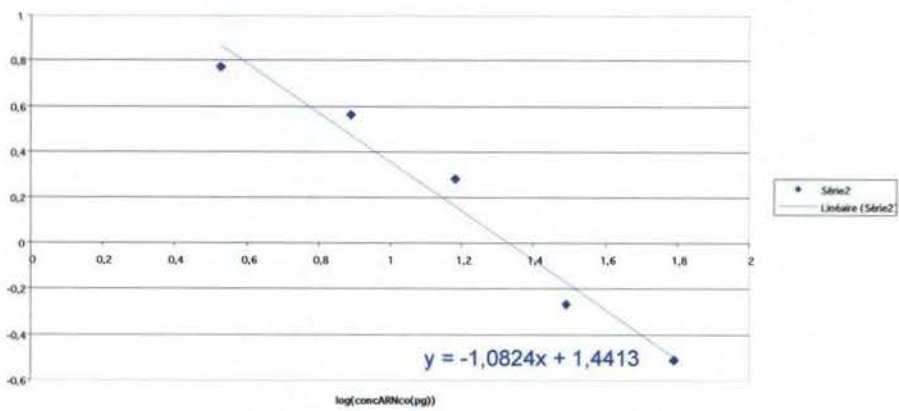
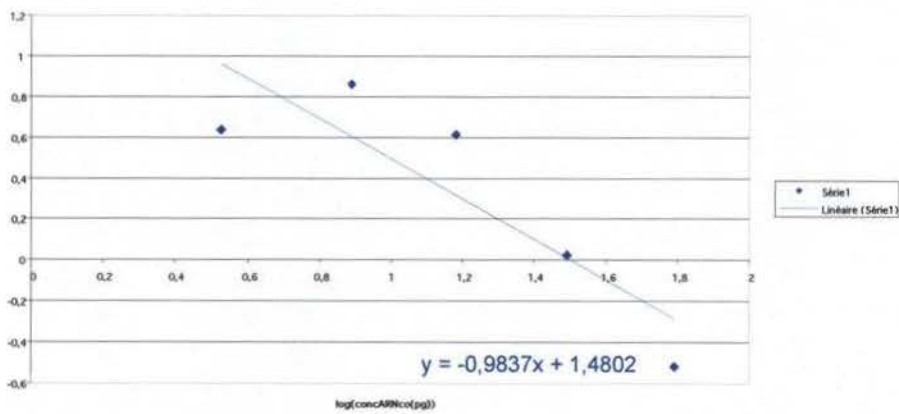
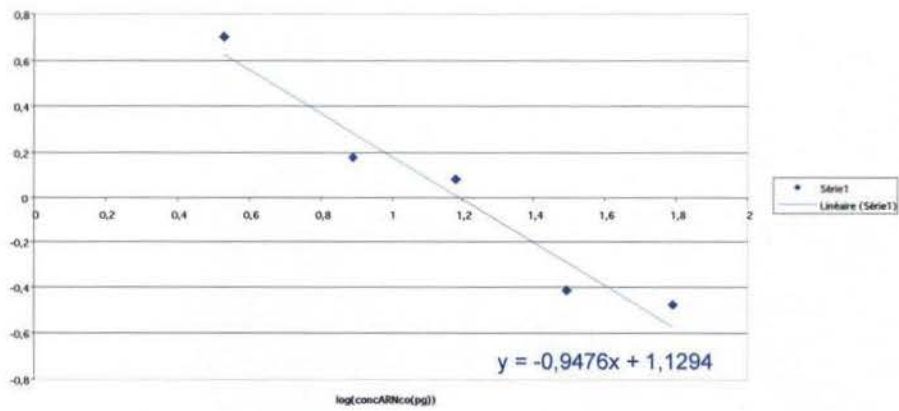
Groupe 2 : restriction

7422



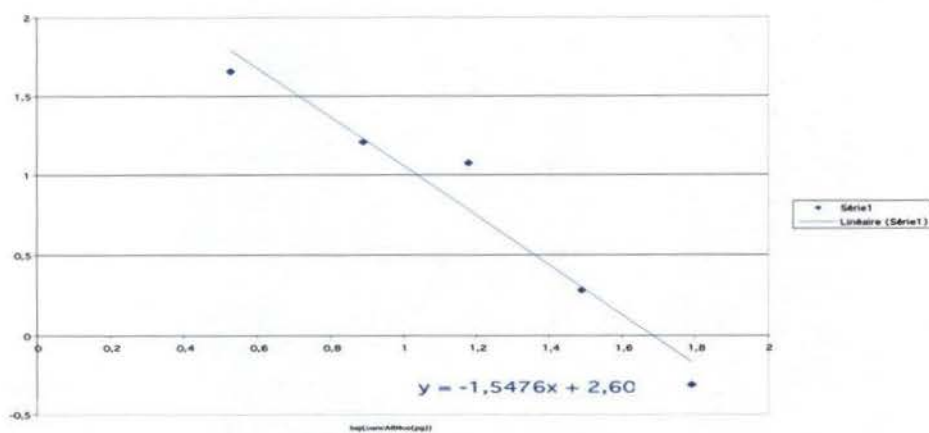
5700



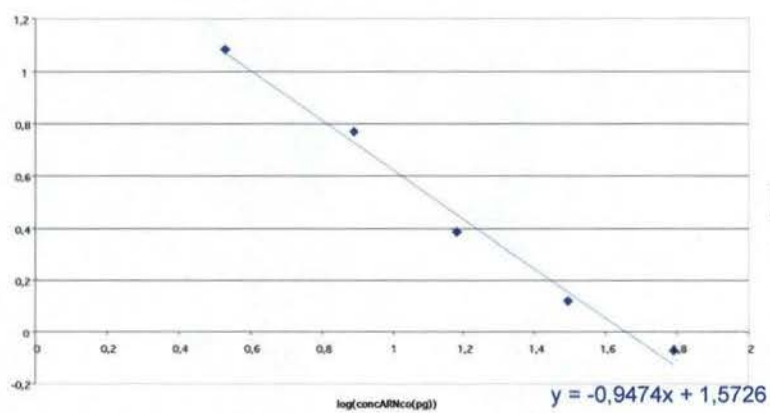


Groupe 3 : restriction-flushing

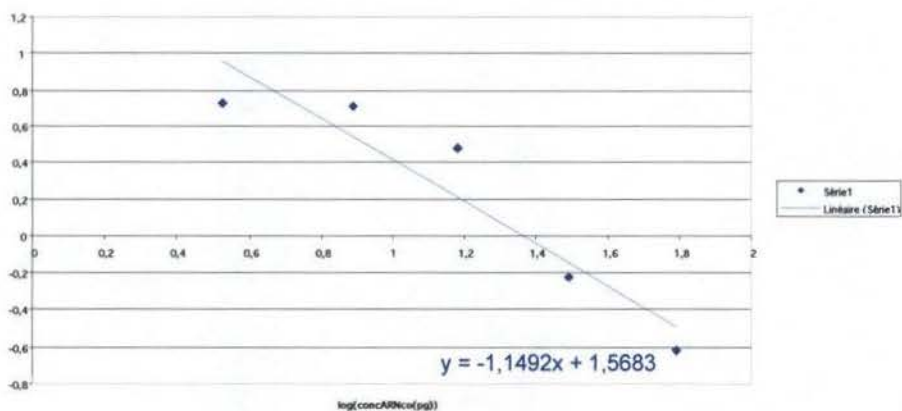
5560



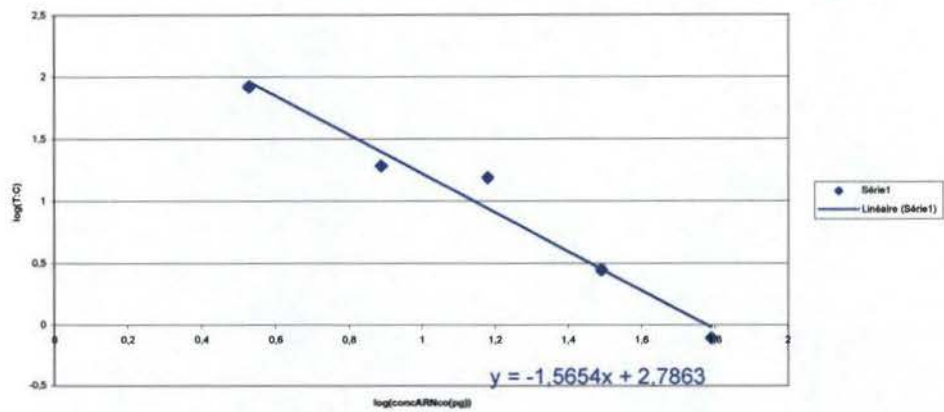
7444



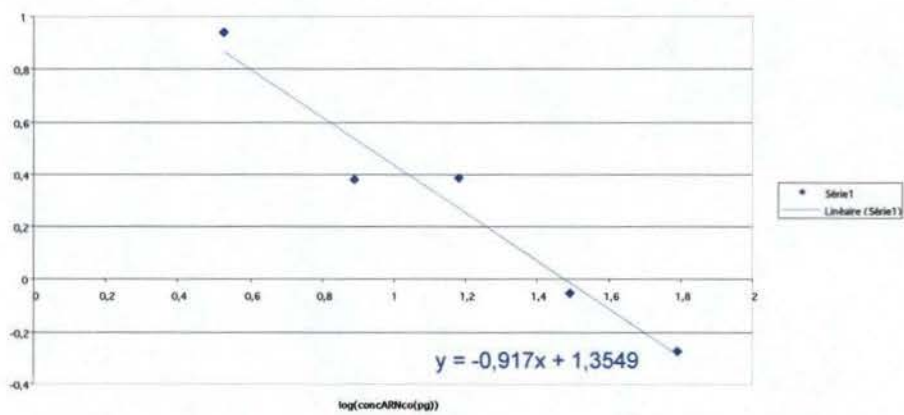
5601



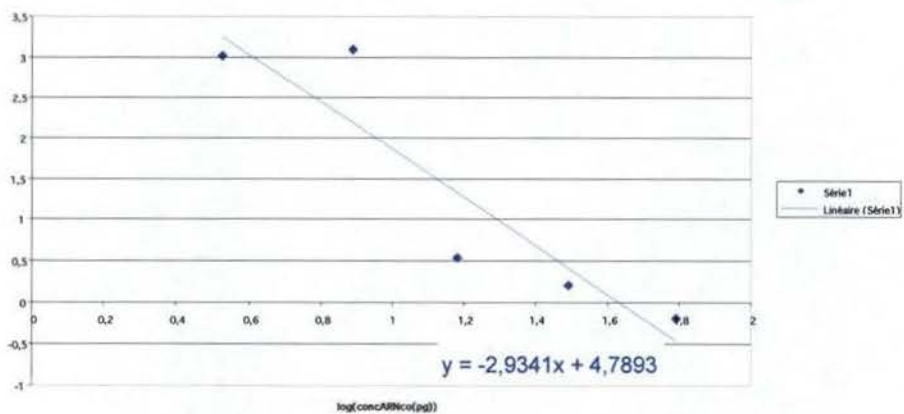
4490



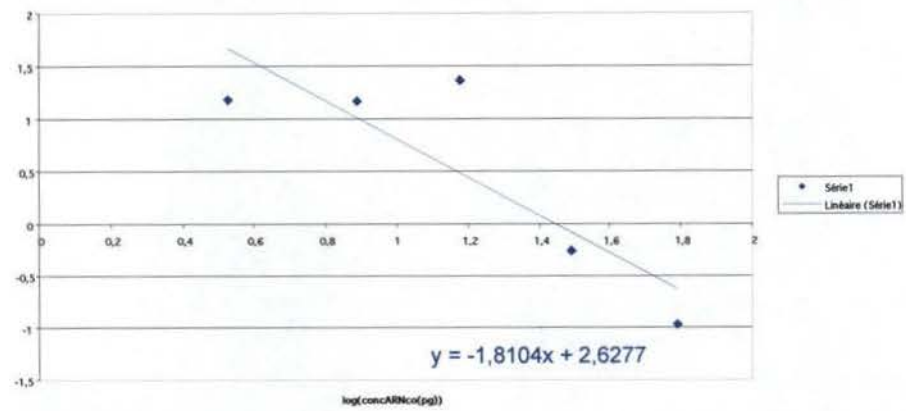
5555



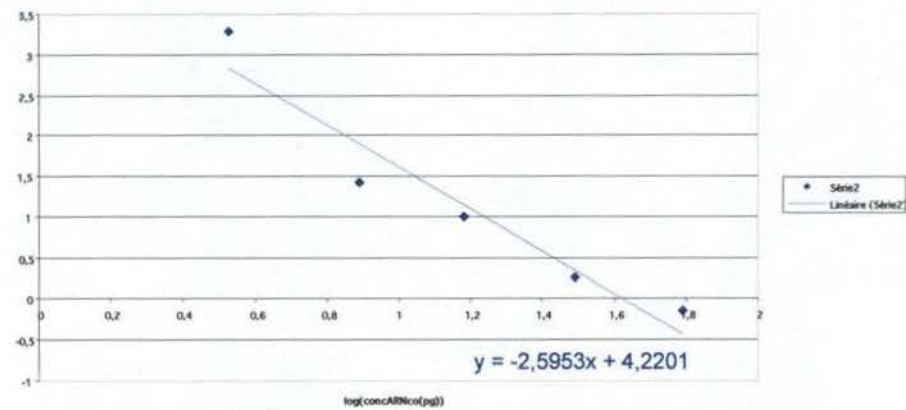
113



5506



7309



Annexe 7 :

Dosages RIA

Dosage de la leptine

Groupe	Race	N°brebis	Leptine (6-07)	Leptine (14-08)	Leptine (12-9)
volonté	SI	2097	2,7	1,7	2,5
volonté	SI	5517	2,7	2,5	1,5
volonté	SL	107	1,8	2,6	2,6
volonté	SL	114	1,8	2,5	2,5
volonté	SL	117	1,3	3,3	3,3
volonté	SL	122	1,8	3,1	6,3
volonté	SL	127	2,1	3,8	2,5
volonté	SL	179	2,5	2,5	4,4
volonté	SL	2016	2,2	2,7	2,2
volonté	SL	2018	2,3	3	3,9
volonté	SL	2032	1,4	2	2,4
volonté	SL	2093	3,2	3,2	2
volonté	SL	2096	2,2	2,8	3,3
volonté	SL	4465	3	1,2	1,3
volonté	SL	5503	2	1,9	1
volonté	SL	5595	2,7	2,7	2,7
volonté	SL	5925	2,4	2,9	1,4
volonté	T	109		2,4	5,2
volonté	T	131	3,5	2,3	1,9
volonté	T	4078	3,7	1,4	3,5
volonté	T	4107	2,4	2,8	2,6
volonté	T	5730	2,2	2,1	3,8
volonté	T	TSN	1,3		1,4
volonté	TI	5550	2	0,7	1,2
volonté	TI	5685	1,5	1,3	1,8
volonté	TI	7365	1,8	1,4	7,1
volonté	TI	7441	3,4	1,8	0,3
volonté	TI	7443	2,7	2,1	1
restriction	SI	5505	0,8	2	1,6
restriction	SL	103	7,1	1,6	1,5
restriction	SL	116	1,8	2,2	6,9
restriction	SL	119	5,2	3	7
restriction	SL	128	2,2	3,1	2,3
restriction	SL	2095	1,5	2,5	3,6
restriction	SL	4417	2,7	2,4	2,4
restriction	SL	4469	1,3	1,2	2,6
restriction	SL	4476	1,3	1,5	2,7
restriction	SL	4565	1,8	1,5	0,2
restriction	SL	4567	0,8	1,4	2
restriction	SL	5618	1,8	1,7	2,3
restriction	SL	5926	1,1	1,7	0,4
restriction	T	5700	2,5	2	1,8
restriction	T	105	2,9	3	3
restriction	T	108	1,9	2,7	4,2
restriction	T	111	1,6	1,7	3,8

restriction	T	129	1,9	1,6	3,1
restriction	T	5741	2,4	2,2	6
restriction	T	7424	2,5	2,2	5,6
restriction	TI	4075		2,3	2
restriction	TI	4077		2,6	0,3
restriction	TI	5504	2,8	1,7	4,5
restriction	TI	5512	2,9	3,9	1,8
restriction	TI	5557	1,5	1,6	0,6
restriction	TI	5561	1,8	1,6	2,3
restriction	TI	5526	2,4	3,2	1,8
restriction	TL	7422	1,2	2,4	3
flushing	SI	5546	1,8	2,3	1,8
flushing	SL	113	2,5	2,5	2,1
flushig	SL	118	5	2,9	0,8
flushing	SL	2098	0,6	0,9	2,8
flushing	SL	4419	1,7	1,9	3
flushing	SL	4474	1	2,6	4,4
flushing	SL	4490	1,5	1,6	2,9
flushing	SL	5601	1,4	3,3	4
flushing	SL	5653	1,2	1,8	3,1
flushing	SL	7309	2,4	2,3	1,4
flushing	SL	7415	0	1,3	1,7
flushing	SL	7421	5,1	2,7	0,3
flushing	T	101	2,4	2	3,4
flushing	T	126	4,5	4,3	1,7
flushing	T	243	2,1	3,5	2,9
flushing	T	4072	1,7	2,1	2,6
flushing	T	7400	3	3,6	3
flushing	T	7442	2,2	2,2	7,8
flushing	TI	5502	1,9	2,6	0,7
flushing	TI	5506	3,4	2,8	0
flushing	TI	5544	0	1,8	3,3
flushing	TI	5555	1,5	2,8	4
flushing	TI	5560	3,6	3,7	5,8
flushing	TI	5736	0,7	2	3,3
flushing	TI	7444	1,5	3	1,5
flushing	TI	7462	2,9	3	3,6
flushing	TL	7404	3,4	2,6	4,7

Dosage de la FSH

Groupe	Race	N°brebis	FSH(6/07)	FSH(14/08)	FSH(12/09)
volonté	SI	2097	11,1	9,4	9,7
volonté	SI	5517	11,9	7,5	12,7
volonté	SL	107	27	9,5	6,1
volonté	SL	114	20,7	9,1	9,9
volonté	SL	117	9,6	7,1	8,6
volonté	SL	122	13,2	15,5	9,1
volonté	SL	127	25,1	19,7	18,3
volonté	SL	179	8,5	8,7	5,6
volonté	SL	2016	10	4,9	6,7
volonté	SL	2018	13,4	10,4	8,6
volonté	SL	2032	6,4	9,7	10,8
volonté	SL	2093	13,8	16,4	17,9
volonté	SL	2096	4,4	12,2	8
volonté	SL	4465	11,2	5,4	5
volonté	SL	5503	7,8	12,3	7,1
volonté	SL	5595	16,7	5,6	6,2
volonté	SL	5925	7,4	6,7	8,2
volonté	T	109	13,7	9,8	8,8
volonté	T	131		9,5	9,4
volonté	T	4078	7,1	16,1	7,9
volonté	T	4107	15,5	20,9	12,2
volonté	T	5730	11,3	9,3	7,9
volonté	T	TSN	9,5		16,9
volonté	TI	5550	9,9	10,5	8,7
volonté	TI	5685	11	13,9	8,6
volonté	TI	7365	14,9	9,3	10,3
volonté	TI	7441	16,7	12,3	5,9
volonté	TI	7443	13,4	14,2	13,6
restriction	SI	5505	5,6	8,8	7,3
restriction	SL	103	22,5	8,4	10,6
restriction	SL	116	24,3	18,7	21,6
restriction	SL	119	15,5	12,4	10,3
restriction	SL	128	12,7	14,8	8,7
restriction	SL	2095	7,4	8,9	13,4
restriction	SL	4417	16,1	8,8	10,4
restriction	SL	4469	11,3	13	10,6
restriction	SL	4476	8,8	9,8	8,8
restriction	SL	4565	10,8	12,3	6,5
restriction	SL	4567	4,4	10,1	11
restriction	SL	5618	18,6	14	24,4
restriction	SL	5926	7,4	10,1	9,7
restriction	T	5700	144,2	159	148,5
restriction	T	105	8	22,9	7,1
restriction	T	108	6,9	13,8	17,4
restriction	T	111	19,2	10	16,4

restriction	T	129	7,3	6,6	6,4
restriction	T	5741	31,6	15,8	13,7
restriction	T	7424	10,1	10,4	9,9
restriction	TI	4075	4,4	8,8	5,7
restriction	TI	4077	20,1	5,4	8,2
restriction	TI	5504	10,9	13,3	11,9
restriction	TI	5512	9,5	13,6	14,6
restriction	TI	5557	12,6	7,1	7,4
restriction	TI	5561	7	11,5	9,5
restriction	TI	5526	8,4	6,6	8,2
restriction	TL	7422	5,7	9,8	8,9
flushing	SI	5546	6,9	5,9	7,1
flushing	SL	113	13	6,4	9
flushing	SL	118	5,5	8,7	6,6
flushing	SL	2098	6,8	5	6,7
flushing	SL	4419	22,8	17,3	8,3
flushing	SL	4474	11,4	7,4	9,2
flushing	SL	4490	6,3	20	11,8
flushing	SL	5601	6,3	6,4	5,5
flushing	SL	5653	8,1	10,9	10,4
flushing	SL	7309	10,1	3,7	6,3
flushing	SL	7415	7,5	7,3	11,6
flushing	SL	7421	21,4	7,8	12,3
flushing	T	101	9,9	8,1	10,9
flushing	T	126	14	12,4	18,8
flushing	T	243	15,5	11,9	14,4
flushing	T	4072	17,3	8,6	10,7
flushing	T	7400	26,1	6,5	39,5
flushing	T	7442	14,6	32,5	18,6
flushing	TI	5502	7,9	13,3	18,2
flushing	TI	5506	7,1	7,6	3,8
flushing	TI	5544	4,3	13	9
flushing	TI	5555	6,7	8,6	9,9
flushing	TI	5560	3,9	6,8	1,5
flushing	TI	5736	7,2	6,8	12
flushing	TI	7444	7	4,6	11,2
flushing	TI	7462	11	7,9	11,4
flushing	TL	7404	9,5	9,3	8,8

Dosage de l'E2

Groupe	Race	N°brebis	E2(6/07)	E2(14/08)	E2(12/09)
volonté	SI	2097	59,9	120,2	76,7
volonté	SI	5517	11,9	8	126
volonté	SL	107	36	16,6	14,8
volonté	SL	114	20,9	16,6	36,1
volonté	SL	117	21,8	19,9	71,8
volonté	SL	122	32,7	22,5	25,9
volonté	SL	127	21,8	16,2	30,5
volonté	SL	179	12,5	25,2	21,1
volonté	SL	2016	1,7	10	30,9
volonté	SL	2018	72,8	89,1	89,7
volonté	SL	2032	16,2	5,3	22,9
volonté	SL	2093	7,1	19,8	69,7
volonté	SL	2096	11,5	10	38,7
volonté	SL	4465	40,3	12,8	46,4
volonté	SL	5503	25,5	35	54
volonté	SL	5595	17,1	52,4	27,8
volonté	SL	5925	6,1	16,8	32,8
volonté	T	109		44,8	15,4
volonté	T	131	37,6	26,2	14,9
volonté	T	4078	4,5	34,8	29,5
volonté	T	4107	13	39,1	54,1
volonté	T	5730	22,1	7,5	73,7
volonté	T	TSN	21,8		27,7
volonté	TI	5550	19,8	34,4	107,7
volonté	TI	5685	16	36	58,5
volonté	TI	7365	4,2	56,6	33,9
volonté	TI	7441	21,1	40,7	28,8
volonté	TI	7443	28,7	0,5	28,1
restriction	SI	5505	84,8	87	77,5
restriction	SL	103	52	77,8	102,8
restriction	SL	116	27,9	20,7	17,8
restriction	SL	119	17,4	29,8	25,8
restriction	SL	128	37,5	66,6	62,8
restriction	SL	2095	89,5	89,2	84,9
restriction	SL	4417	65	546	44,6
restriction	SL	4469	50	71,8	112,5
restriction	SL	4476	29,3	89,7	107,1
restriction	SL	4565	151,5	82,8	102,5
restriction	SL	4567	101,6	79	95,7
restriction	SL	5618	108,8	52,6	152,2
restriction	SL	5926	140	84,8	30
restriction	T	5700	66,1	65,9	58,7
restriction	T	105	167,4	72,4	78,9
restriction	T	108	85,8	87,1	65
restriction	T	111	87,5	137	74,9

restriction	T	129	61,8	119,6	109,6
restriction	T	5741	57,1	77,1	81,7
restriction	T	7424	66,2	82,1	52,3
restriction	TI	4075	231,6	56,5	14,4
restriction	TI	4077	273,4	78,3	77,8
restriction	TI	5504	218,1	85,5	14,4
restriction	TI	5512	111,5	70,6	77,8
restriction	TI	5557	122,2	104,2	78,4
restriction	TI	5561	167,8	89,1	58,7
restriction	TI	5526	67	102,9	89,5
restriction	TL	7422	63,8	81,3	95,4
flushing	SI	5546	85,1	115,4	73,5
flushing	SL	113	84,4	98,7	122,4
flushing	SL	118	91,3	73,6	123,6
flushing	SL	2098	95,5	62,3	115,8
flushing	SL	4419	104,4	74,3	115,3
flushing	SL	4474	88,3	66,9	89,8
flushing	SL	4490	77,2	67,9	149,3
flushing	SL	5601	87,1	44,7	148,7
flushing	SL	5653	57,4	136,2	125,3
flushing	SL	7309	77,4	177	109,3
flushing	SL	7415	100,5	323,8	113,9
flushing	SL	7421	86	92,7	137,2
flushing	T	101	70,3	126,2	108,2
flushing	T	126	97,4	109,2	97,2
flushing	T	243	74,1	109	138,5
flushing	T	4072	73	174,7	125,3
flushing	T	7400	100,3	128,5	109,9
flushing	T	7442	80,4	134,2	105
flushing	TI	5502	109,1	87,8	124,3
flushing	TI	5506	101,8	136,5	118,5
flushing	TI	5544	76,2	137,7	110,6
flushing	TI	5555	65,6	209,6	102
flushing	TI	5560	54,8	118,1	146,3
flushing	TI	5736	83,7	87,4	115,1
flushing	TI	7444	59,7	135	117,1
flushing	TI	7462	68,5	121,8	118,2
flushing	TL	7404	80,9	119	107,6

Dosage de la LH

Groupe	Race	N°brebis	LH(6/07)	LH(14/08)	LH(12/09)
volonté	SI	2097			
volonté	SI	5517			
volonté	SL	107	0,3		
volonté	SL	114			
volonté	SL	117			
volonté	SL	122	0,5	0,2	0,4
volonté	SL	127	0,3	0,3	0,5
volonté	SL	179			
volonté	SL	2016			
volonté	SL	2018			
volonté	SL	2032			
volonté	SL	2093			
volonté	SL	2096			
volonté	SL	4465	0,3	0,4	0,3
volonté	SL	5503			
volonté	SL	5595			
volonté	SL	5925	0,2	0,2	
volonté	T	109		0,3	0,3
volonté	T	131			
volonté	T	4078			
volonté	T	4107			
volonté	T	5730			
volonté	T	TSN	0,2		0,4
volonté	TI	5550			
volonté	TI	5685			
volonté	TI	7365	0,6	0,4	0,2
volonté	TI	7441	0,3	0,2	0,3
volonté	TI	7443	0,4	0,3	0,3
restriction	SI	5505			
restriction	SL	103	0,3	0,2	0,2
restriction	SL	116			
restriction	SL	119	0,2	0,4	0,3
restriction	SL	128			
restriction	SL	2095			
restriction	SL	4417			
restriction	SL	4469			
restriction	SL	4476			
restriction	SL	4565		0,5	0,4
restriction	SL	4567			
restriction	SL	5618			
restriction	SL	5926			
restriction	T	5700			
restriction	T	105	0,4	0,3	0,4
restriction	T	108			
restriction	T	111			

restriction	T	129			
restriction	T	5741	0,9	0,4	0,3
restriction	T	7424	0,2	0,1	1
restriction	TI	4075	0,3	0,3	0,3
restriction	TI	4077	0,4	0,3	0,4
restriction	TI	5504			
restriction	TI	5512			
restriction	TI	5557	0,3	0,5	0,3
restriction	TI	5561			
restriction	TI	5526	0,4	0,5	0,2
restriction	TL	7422	0,4	1	0,3
flushing	SI	5546			
flushing	SL	113			
flushing	SL	118	0,2	0,3	0,3
flushing	SL	2098			
flushing	SL	4419			
flushing	SL	4474			
flushing	SL	4490	0,3	0,6	0,5
flushing	SL	5601	0,2	0,3	0,1
flushing	SL	5653	0,4	0,4	0,4
flushing	SL	7309			
flushing	SL	7415			
flushing	SL	7421			
flushing	T	101			
flushing	T	126			
flushing	T	243	0,3	0,2	0,9
flushing	T	4072			
flushing	T	7400			
flushing	T	7442	0,3	1	0,5
flushing	TI	5502			
flushing	TI	5506			
flushing	TI	5544			
flushing	TI	5555	0,2	0,2	0,2
flushing	TI	5560	0,5	0,3	0,4
flushing	TI	5736	0,2	0,3	0,6
flushing	TI	7444			
flushing	TI	7462			
flushing	TL	7404	0,3	0,6	0,3